

Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava



DIPLOMOVÁ PRÁCE

SPRi v biochemické analýze

SPRi in biochemical analysis

Autor práce:

Bc. Zuzana Grosmanová

Studijní obor:

Nanotechnologie

Vedoucí diplomové práce:

doc. Dr. Ing. Michal Lesňák

Ostrava 2018

Zadání diplomové práce

Student: **Bc. Zuzana Grosmanová**

Studijní program: N3942 Nanotechnologie

Studijní obor: 3942T001 Nanotechnologie

Téma: **SPRi v biochemické analýze**
SPRi in biochemical analysis

Jazyk vypracování: čeština

Zásady pro vypracování:

Metoda SPRi je progresivní metoda pro detekci různých biochemických látek, zejména proteinů. Cílem diplomové práce je ověřit schopnost metody SPRi detekovat nízké koncentrace proteinů.

Vlastní práce bude zahrnovat následující:

1. Vypracování písemné rešerše z literatury o SPRi (Surface Plasmon Resonance imaging).
2. Provádění biochemických měření v laboratoři.
3. Příprava biočipu pro SPRi měření.
4. Vlastní návrh SPRi experimentu.
5. Zpracování výsledků.

Seznam doporučené odborné literatury:

SKLÁDAL, Petr. Biosenzory [online]. Brno, 2002.

HOMOLA, Jiří, et al.. Surface plasmon resonance biosensors. Optical Biosensors. 2002.

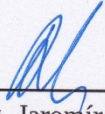
JANATA, Jiří. 2007. Senzory [online]. Praha. ISBN 978-80-86238-20-3.

Formální náležitosti a rozsah diplomové práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.


Vedoucí diplomové práce: **doc. Dr. Ing. Michal Lesňák**

Datum zadání: 10.11.2017

Datum odevzdání: 21.05.2018


prof. Ing. Jaromír Pištora, CSc.
vedoucí katedry




Ing. Zdeňka Chmelíková, Ph.D.
prorektorka pro studium

Místopřísežné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce s použitím odborné literatury a pramenů, uvedených v seznamu použité literatury.

V Ostravě, dne 21. 5. 2018

.....

Podpis autora

Prohlášení

Prohlašuji, že

- jsem byla seznámena s tím, že na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. - autorský zákon, zejména § 35 - užití díla v rámci občanských a náboženských obřadů, v rámci školních představení a užití díla školního (§ 60 - školní dílo);
- беру на вѣдомі, že Vysoká škola Báňská - Technická univerzita Ostrava (dále jen VŠB - TUO) má právo nevýdělečné ke své vnitřní potřebě diplomovou práci užít (§35 odst. 3);
- souhlasím s tím, že diplomová práce bude archivována v elektronické formě v databázi Ústřední knihovny VŠB - TUO a v elektronické podobě bude uložena také u vedoucího diplomové práce. Souhlasím s tím, že údaje o diplomové práci budou zveřejněny v informačním systému VŠB - TUO;
- bylo sjednáno, že s VŠB - TUO, v případě zájmu z její strany, uzavřu licenční smlouvu s oprávněním užít dílo v rozsahu § 15 odst. 4 autorského zákona;
- bylo sjednáno, že užít své dílo - diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem VŠB - TUO, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly VŠB - TUO na vytvoření díla vynaloženy (až do její skutečné výše);
- беру на вѣдомі, že odevzdáním své diplomové práce souhlasím s jejím zveřejněním podle zákona č. 111/1998Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (Zákon o vysokých školách) bez ohledu na výsledek obhajoby.

V Ostravě, dne 21. 5. 2018

.....
Podpis (jméno a příjmení studenta)

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu své diplomové práce doc. Dr. Ing. Michalu Lesňákovi za cenné rady a připomínky, které mi v průběhu psaní práce poskytl a také za ochotu, trpělivost a veškerý čas, který mi věnoval.

Dále bych chtěla poděkovat Ing. Radku Svobodovi za odborné vedení při výrobě SPRi biočipů a také Ing. Kláře Drobíkové za provedení AFM měření a konzultaci výsledků.

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá biochemickými měřeními pomocí optické metody SPRi (Surface Plasmon Resonance imaging). Cílem práce bylo nalézt vhodnou referenční látku sloužící jako negativní kontrola. Nalezením této látky by bylo umožněno detekovat nižší koncentrace analyzovaných proteinů v roztoku. Referenční látka byla hledána mezi skupinou zvolených antigenů. Jako analyty pro účely experimentu sloužily roztoky sérových albuminů různých zvířecích druhů. Jednotlivé koncentrace analyzovaných albuminů v roztoku byly 100, 10 a 1 mg/l. V rámci práce byly navrženy a připraveny dva SPRi biočipy. A na těchto biočipech byla provedena biochemická měření. V rámci práce byla také využita mikroskopie atomárních sil AFM ke studiu zlatého povrchu SPRi biočipu.

KLÍČOVÁ SLOVA

SPR (Surface Plasmon Resonance), Plasmon, SPRi (Surface Plasmon Resonance imaging), AFM, biosenzor, příprava biočipu, sérový albumin, ovalbumin, BSA, HSA, krysí albumin, ovčí albumin, IgG, antigen

Abstract

This diploma thesis deals with biochemical measurements using Surface Plasmon Resonance imaging (SPRi). The aim of the work was to find a suitable reference substance serving as a negative control. Finding this substance would allow detecting lower concentrations of the analyzed proteins in the solution. The reference substance was searched between a selected antigens. Serum albumins from various animal species have served as analytes for the purpose of the experiment. The individual concentrations of analyzed albumin in solution were 100, 10 and 1 mg / l. Two SPR biochips were designed and prepared in the work. Biochemical measurements were performed on these biochips. At the same time, AFM atomic force microscopy was used to study the golden surface of the SPRi biochip.

KEYWORDS

SPR (Surface Plasmon Resonance), Plasmon, SPRi (Surface Plasmon Resonance imaging), AFM, biosenzor, preparation of biochip, albumin from serum, ovalbumin, BSA, HSA, rat albumin, sheep albumin, IgG, antigen

Obsah

1	Úvod.....	11
2	Cíl práce	12
3	Teoretická část.....	13
3.1	Základní pojmy z optiky	13
3.1.1	Světlo.....	13
3.1.2	Odraz a lom	14
3.1.3	Polarizace	16
3.1.4	Metody polarizace světla	17
3.2	Maxwellovy rovnice	19
3.3	Zeslabený úplný odraz - ATR, evanescentní vlna.....	20
3.4	Rezonance povrchových plasmonů - SPR (Surface plasmon resonance)	21
3.4.1	Ottovo a Kretschmannovo uspořádání.....	21
3.4.2	Podmínky vzniku SPR.....	22
3.5	SPRi - Surface plasmon resonance imaging	23
3.6	Biosenzor, SPRi biočip	24
3.7	Typy biosenzorů.....	25
3.7.1	Enzymové biosenzory	25
3.7.2	DNA a RNA biosenzory.....	26
3.7.3	Mikrobiální a tkáňové biosenzory	26
3.7.4	Imunosenzory	26
3.8	Povrchová chemie	27
3.9	Albuminy	28
3.10	Metoda AFM.....	29
3.10.1	Parametry drsnosti:	30
3.11	Biočipy použité pro experiment	31
3.12	Použité chemikálie	32
3.13	Aparatura pro nanášení antigenů na biočip SPRi	33
3.13.1	Princip nanášení spotu.....	33
3.13.2	Spotovací cyklus.....	34
3.14	Aparatura pro měření metodou SPRi	35
3.15	Průběh měření metodou SPRi	36
3.15.1	Čištění.....	36

3.15.2	Definování masky biočipu.....	36
3.15.3	Kalibrace	37
3.15.4	Cyklus měření koncentrace vzorku	37
4	Praktická část	38
4.1	Návrh vlastního experimentu	38
4.2	Výroba SPRI biočipu	39
4.2.1	Diskuze a zhodnocení připravených SPRI biočipů.....	40
4.3	Vlastní měření.....	42
4.4	Výsledky z měření - biočip 3389	43
4.5	Výsledky z měření - biočip 3385	46
4.6	Charakterizace povrchu biočipu pomocí AFM	47
5	Závěr.....	53
6	Seznam použité literatury	54

Seznam zkratek a značek

AC	dynamický režim, anglicky Alternating Current
AFM	mikroskopie atomárních sil z anglického Atomic Force Microscopy
ATR	zeslabený úplný odraz z anglického Attenuated Total Reflectance
a-ova	antiovalbumin
<i>B</i>	vektor magnetické indukce
BSA	hovězí sérový albumin z anglického Bovine Serum Albumin
<i>c</i>	rychlost světla ve vakuu
CCD	Charge – Coupled Device
cm	centimetr
CVD	chemická depozice par z anglického Chemical Vapour Deposition
<i>D</i>	vektor elektrické indukce
Da	dalton
DC	statický režim, anglicky Direct Current
<i>d_p</i>	hloubka průniku
<i>E</i>	vektor intenzity elektrického pole
<i>E</i>	elektrická intenzita
ELISA	z anglického Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ϵ_0	permitivita vakua
ϵ_r	relativní permitivita
<i>f</i>	frekvence
<i>h</i>	Planckova konstanta
<i>H</i>	vektor intenzity magnetického pole
HSA	lidský sérový albumin z anglického Human Serum Albumin
Hz	hertz
γ	konstanta měrné vodivosti
<i>i</i>	imaginární jednotka
IgG	imunoglobulin třídy G
<i>k</i>	vlnový vektor
LED	dióda emitující světlo z anglického Light - Emitting Diode
λ	vlnová délka
m	metr
mg	miligram
ml	mililitr

mM	milimol
mol/l	mol na liter
μl	mikrolitr
$\mu\text{l}/\text{min}$	mikrolitr za minutu
μ_0	permeabilita vakua
μ_r	relativní permeabilita
n	index lomu
nm	nanometr
π	Ludolfovo číslo
p	hybnost
PBS	Phosphate buffered salina
θ	úhel
θ_m	mezní úhel
θ_B	Brewsterův úhel
ρ	hustota volných nábojů
R	odrazivost, reflektivita
\mathbf{r}	prostorový vektor
R_a	parametr drsnosti
R_{MS}	kvadratický průměr z anglického Root Mean Square
SAM	z anglického Self - Assembled Monolayer
SDS	sodiumdodecylsulfát
SPR	Surface Plasmon Resonance
SPRi	Surface Plasmon Resonance imaging
STM	skenovací tunelová mikroskopie z anglického Scanning tunneling microscopy
ω	úhlová rychlost
t	čas
v	rychlost
s	sekunda
x, y, z	označení směrů
∇	operátor nabla

1 Úvod

Diplomová práce je zaměřena na biochemická měření pomocí metody SPRi. Tato metoda je v dnešní době velice populárním a moderním řešením pro kvantitativní analýzu a charakterizaci biomolekulárních interakcí. Své uplatnění díky tomu nachází v běžné klinické praxi pro lékařskou diagnostiku, v potravinářském průmyslu, v oboru životního prostředí a také ve farmaceutickém průmyslu při screeningu drog. Jedná se o vysoce citlivou a rychlou metodu, která je vhodná k detekci a analýze proteinů o nízkých koncentracích. Díky snímacímu prvku CCD kamery může být současně analyzováno a monitorováno řádově sto různých látek a biochemických interakcí, a to vše v reálném čase. Tato multi-detekce bez nutnosti značení staví SPRi jako efektivní metodu vedle těch běžných a standardně užívaných (ELISA).

Obsah teoretické části je postaven na písemné rešerši z dostupné literatury. Je tvořen souhrnem základních pojmů z oblasti fyziky - optiky, metody zeslabeného totálního odrazu - ATR a pokračuje úvodem do rezonance povrchových plasmonů SPR a metody SPRi. Rešerše je dále rozšířena o kapitoly věnující se biochemii biosenzorů, albuminům a metodě AFM. Díky rešerši je nastíněno nejmodernější využití metody SPRi, která díky vývoji a výzkumu nachází čím dál častěji místo vedle standardních analytických metod.

Praktická část je zaměřena na realizaci vlastního experimentu, kterému předcházela návrh a příprava SPRi biočipu. Myšlenkou experimentu bylo využít multidetekce metody SPRi k nalezení vhodné referenční látky sloužící jako negativní kontrola. Nalezením vhodnější negativní kontroly, než je stávající látka IgG, by mohly být lépe odladěny fyzikální vlivy analyzovaného vzorku, a tím by bylo umožněno detekovat látky o ještě nižších koncentracích. Navrhla a připravila jsem dva SPRi biočipy s několika různými druhy proteinů. Pro tyto biočipy byla navržena série měření, při kterých byla sledována a následně porovnávána biochemická odezva na sérové albuminy různých zvířecích druhů. Výsledná data jsou zpracována a vyhodnocena v této práci. Práce je také doplněna o výsledky analýzy povrchu zlaté vrstvy biočipu SPRi pomocí metody AFM.

2 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo navrhnout a realizovat vlastní SPRi experiment. Obsahem teoretické části je rešerše z literatury o metodě SPRi. Prostudováním dostupných zdrojů byly formulovány vlastní návrh experimentu a vlastní návrh výroby SPRi biočipu.

Dílčím cílem bylo připravit SPRi biočipu k měření dle vlastního návrhu. A poté byla realizována série biochemických měření v laboratořích VŠB - Technické univerzity v Ostravě. V rámci experimentu bylo využito schopnosti metody SPRi detekovat proteiny o nízkých koncentracích. A proto koncentrace připravených vzorků nebyla vyšší než 100 mg/l.

Diplomová práce obsahuje popis vlastního experimentu a výsledky z provedených měření jsou přehledně zpracovány formou grafů a tabulek. Pro splnění praktických úkolů byl kladen důraz na osvojení si laboratorních technik a postupů spjatých s moderní metodou SPRi.

3 Teoretická část

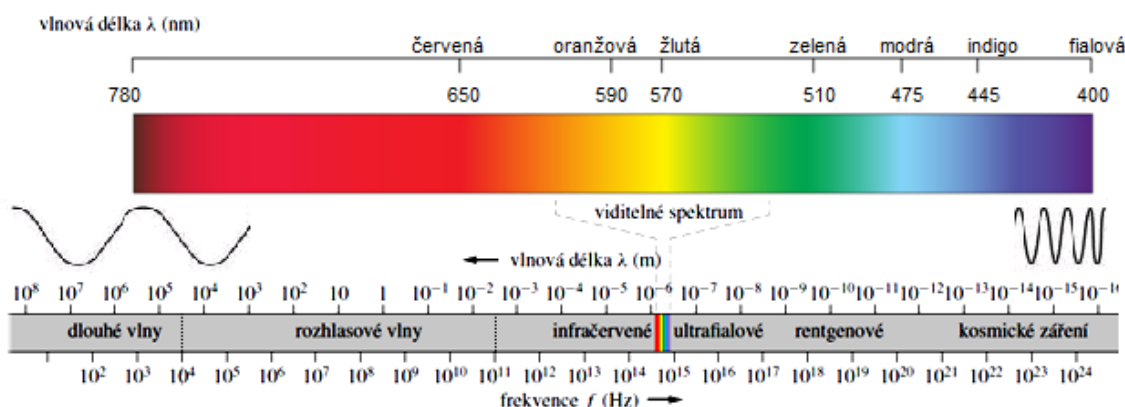
3.1 Základní pojmy z optiky

Pro pochopení problematiky resonance povrchových plasmonů (SPR) je zapotřebí znalost optiky, a to především oblast elektromagnetismu. V této části budou připomenuty některé základní pojmy optiky, o které se opírá metoda i problematika SPR.

3.1.1 Světlo

Světlo je fyzikální jev a zároveň druh energie. Optika, jako část fyziky, se zabývá světlem a jeho energetickými přeměnami, šířením v různých prostředích a materiálech. Popisuje jevy, kterým světlo podléhá nebo které naopak vyvolává.

Povaha světla vykazuje zvláštní duální charakter - korpuskulární a vlnový. Při popisu optických jevů je dnes nutné využívat obou těchto představ, kdy korpuskulární charakter je projevován spíše v krátkovlnném spektru a vlnový charakter v dlouhovlnném spektru [1, 2].



Obr. 1: Elektromagnetické spektrum.

Dnes je známo, že světlo je elektromagnetické vlnění, které je tvořeno elektrickým a magnetickým polem, kdy vektory intenzit těchto polí jsou na sebe kolmé. Zároveň víme, že světlo je pohlcováno nebo vyzařováno v určitých dávkách energie - kvantech. Tato kvanta nazýváme „částicemi“ světla - fotony. Velikost kvantové energie je vyjádřena vztahem mezi vlnovou délkou λ , Planckovou konstantou označenou jako h a rychlostí světla c [1, 2].

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (1.1)$$

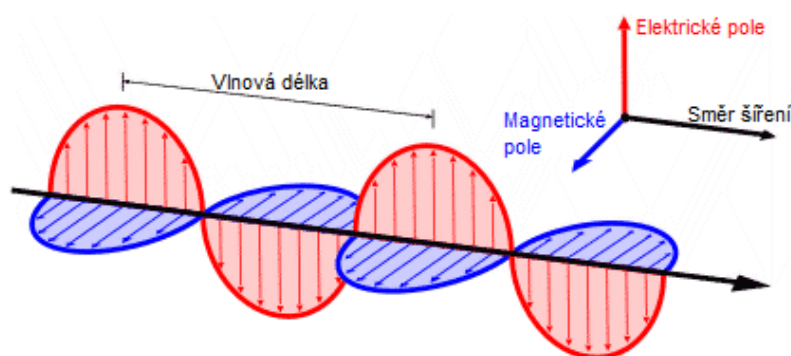
Foton jako částice, která se pohybuje rychlostí světla, nemá hmotnost, ale popisujeme jeho hybnost p vztahem (1.2) [1, 2].

$$p = \frac{h}{\lambda} \quad (1.2)$$

Rychlost světla lze odvodit z fázové rychlosti vlny v v prostředí, kdy po dosazení permeability vakua $\mu_0 = \frac{1}{\varepsilon_0 c^2}$ dojdeme k výsledku, že $v = c$.

$$v = \frac{1}{\sqrt{\varepsilon_r \varepsilon_0 \mu_r \mu_0}} \quad c = \frac{1}{\sqrt{\varepsilon_0 \mu_0}} \quad (1.3)$$

Hodnotu rychlosti světla c ve vakuu zjistíme dosazením známých konstant permeability μ_0 a permitivity ε_0 vakua do výsledného vztahu (1.3). Rychlost světla je poté rovna hodnotě $c = 299\,792\,458$ m/s [2].



Obr. 2: Elektromagnetická vlna složená z elektrické E a magnetické B složky.

3.1.2 Odraz a lom

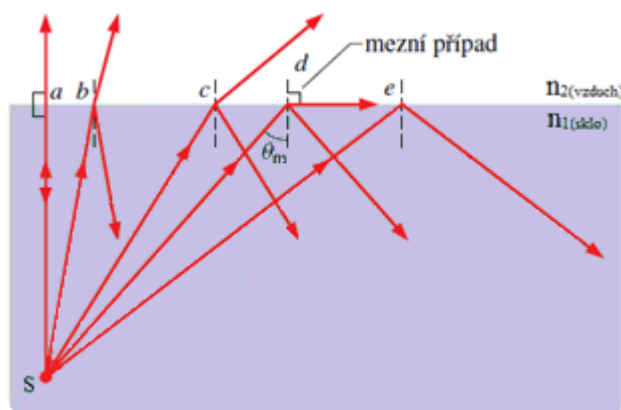
Pro některé z jednodušších optických jevů není nutné dívat se na světlo jako elektromagnetické vlnění a pro jejich popis stačí pracovat se světelnými paprsky. S tímto zjednodušením pracuje geometrická/paprsková optika, která se zabývá otázkou šíření světla.

Zákony paprskové optiky stojí na Fermatově principu, dále na principu nezávislosti světelných paprsků a na rozhraní dvou prostředí se šíření světla řídí zákonem odrazu a lomu [1, 2].

Fermatův princip říká, že světlo se v homogenním prostředí šíří po nejkratší trajektorii z bodu A do bodu B. Toto šíření nazýváme přímočaré a trajektorií je přímka. Druhým principem je popsáno, že paprsky se ve světelném toku neovlivňují, jsou na sobě nezávislé a šíří se jako by ostatních svazků nebylo [2].

Když dopadá paprsek na rozhraní dvou prostředí, dojde k jeho rozdělení na dva paprsky: lomený a odražený. Lomený paprsek je ten, který prostupuje do druhého prostředí a odražený paprsek pokračuje v šíření prvním prostředím. Úhel, který svírá dopadající nebo odražený paprsek s kolmicí vedenou bodem dopadu, nazýváme úhel dopadu θ_1 resp. úhel odrazu.

Platí, že úhel odrazu je roven úhlu dopadu. Rovina dopadu je určena dopadajícím paprskem a kolmicí dopadu [2].



Obr. 3: Paprsek světla na rozhraní sklo/vzduch: a) paprsek kolmo dopadající je částečně také odražen zpět, b) a c) paprsek je částečně odražen i lomen, d) mezní případ, kdy dochází ještě k lomu, e) totální odraz paprsku.

Úhel lomu θ_2 je svíráán lomeným paprskem a kolmicí dopadu a jeho velikost je ovlivněna indexem lomu prostředí n

$$n = \frac{c}{v}, \quad (1.4)$$

kde v je rychlost světla v daném prostředí. Lom ke kolmici nastane při přechodu paprsku z opticky řidšího prostředí do opticky hustšího a úhel lomu je menší než úhel dopadu. Paprsek se láme od kolmice při přechodu z opticky hustšího prostředí do prostředí opticky řidšího. Vztah mezi úhly dopadu a lomu a indexy lomů daných prostředí je vyjádřen Snellovým zákonem lomu [3].

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2 \quad (1.5)$$

Pro popis elektromagnetické rovinné vlny, která se šíří prostředím o indexu lomu n , můžeme využít matematický zápis pro elektrické pole dle rovnice 1.6

$$E = E_0 \cdot e^{(i\omega t - i\mathbf{k}\mathbf{r})} = E_0 \cdot e^{(i\omega t - ik_x x - ik_y y - ik_z z)}, \quad (1.6)$$

kde $\mathbf{r} = (x, y, z)$ je polohový vektor, $\mathbf{k} = (k_x, k_y, k_z)$ je vlnový vektor, E_0 je amplituda elektrického pole, ω je úhlová rychlost a i je imaginární jednotka ($i^2 = -1$). Vlnový vektor \mathbf{k} je rovnoběžný se směrem šíření vlny a jeho velikost je vyjádřena vztahem 1.7

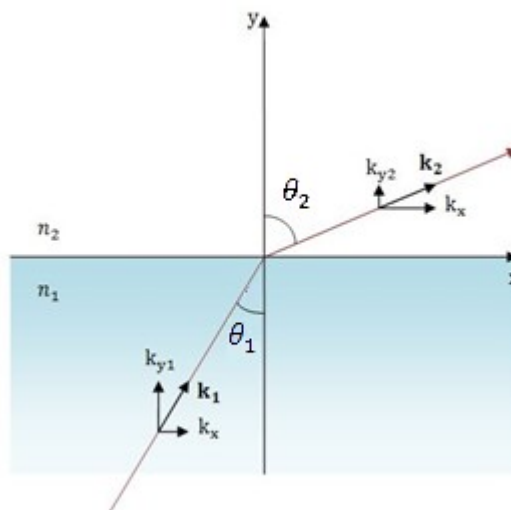
$$k = \sqrt{k_x^2 + k_y^2 + k_z^2} = n \frac{2\pi}{\lambda} = n \frac{\omega}{c}, \quad (1.7)$$

kde n je index lomu prostředí a λ je vlnová délka.

Díky spojitosti tečných složek vektorů pole, lze Snellův zákon ekvivalentně vyjádřit rovnicí 1.8

$$k_{x1} = k_{x2} = k_x, \quad (1.8)$$

kde k_{x1} je x -ová složka vlnového vektoru \mathbf{k}_1 v prostředí n_1 a k_{x2} je x -ová složka vlnového vektoru \mathbf{k}_2 v prostředí n_2 , viz obrázek 1. Při dopadu, lomu i odrazu se kmitočet vlny ω nemění [3].



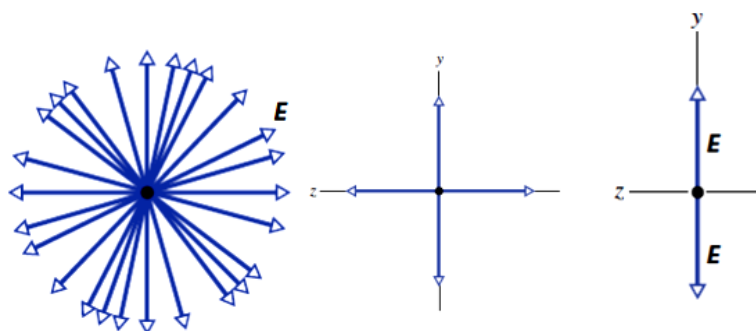
Obr. 4: Snellův zákon vyjádřen pomocí vlnového vektoru [3].

Největší možný úhel dopadu, pod kterým ještě nastává lom paprsku, se nazývá mezní úhel θ_m . Pro dopad paprsku pod úhlem větším než je mezní úhel θ_m nastává úplný odraz paprsku [3].

$$\theta_m = \arcsin \frac{n_2}{n_1} \quad (1.9)$$

3.1.3 Polarizace

Pro popis jevů jako je polarizace, interference, ohyb světla nebo disperze je nutné vycházet z vlnové povahy světla. Světlo je elektromagnetickým příčným vlněním charakterizované dvěma na sebe kolmými vektory: \mathbf{E} - intenzitou elektrického pole a \mathbf{B} - intenzitou magnetického pole. Tyto vektory jsou zároveň kolmé na směr šíření vlny, proto je světlo příčným vlněním. Díky tomu, že vektory jsou na sebe stále kolmé, lze pro následující popis polarizace vybrat jen jednu z intenzit, a tou bude elektrická intenzita \mathbf{E} [1, 2].



Obr. 5: Směr paprsku na obrázku je kolmý na tuto stránku.

Vlevo: Nepolarizované světlo - čelní pohled na vektor elektrické intenzity E se stejnou amplitudou. **Uprostřed:** Nepolarizované světlo - obecný zápis. **Vpravo:** Lineárně polarizované světlo [1].

Zdrojem nepolarizovaného světla jsou například Slunce nebo žárovka. Vektory intenzit se stáčí kolem směru šíření nepravidelně, náhodně. Naopak pro polarizované světlo je zajištěno, že všechny vektory intenzity kmitají v jedné rovině. V tomto případě se hovoří o světle lineárně polarizovaném. Dále ještě rozlišujeme polarizaci eliptickou s jejím speciálním případem kruhové polarizace. Pro použití v metodě SPRi využíváme polarizaci lineární [1, 2].

3.1.4 Metody polarizace světla

Nepolarizované světlo může být převedeno na lineárně polarizované několika způsoby, kdy ovšem vždy dochází k menší ztrátě intenzity světla. Mezi nejběžnější patří polarizace odrazem, lomem, dvojlomem nebo za využití tzv. polaroidů.

Polarizace odrazem a lomem

Odražený paprsek světla je vždy částečně polarizován. Pro docílení úplné polarizace paprsku, lze vypočítat pod jakým úhlem, má na rozhraní dvou prostředí dopadat. Tento úhel se nazývá Brewsterův úhel θ_B a je ovlivněn indexy lomu daných prostředí

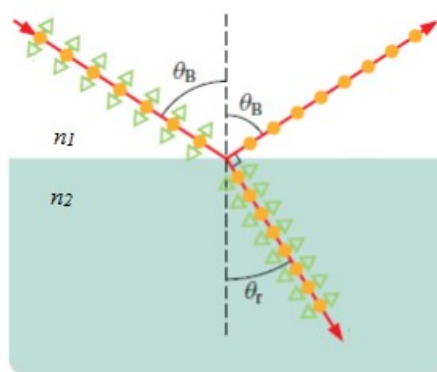
$$\theta_B = \arctg\left(\frac{n_2}{n_1}\right), \quad (1.10)$$

kde n_2 je index lomu prostředí lomu a n_1 je index lomu prostředí dopadu [1, 2].

Na Obr. 6 je lineární polarizace odrazem schematicky zakreslena. Dopadající, lomený a odražený paprsek leží v jedné rovině - rovina dopadu. Dopadající nepolarizovaný paprsek je na obrázku zakreslen pomocí teček a šipek. Tečka znázorňuje vektor elektrické intenzity, který je na rovinu dopadu kolmý, takto je značen typ s -polarizace. Šipka představuje

elektrickou intenzitu, která leží v rovině dopadu, a značíme takto typ p -polarizace. Z obrázku tedy vidíme, že odražený paprsek je s -polarizovaný [1, 2].

Lomený paprsek je polarizován pouze částečně. Skládá se z obou složek elektrické intenzity s - i p -, ale složka s - je slabší. Aby došlo k úplné polarizaci i lomeného paprsku, bylo by zapotřebí, aby prošel lomem několikrát například řadou rovnoběžných skleněných destiček [1, 2].



Obr. 6: Znázornění polarizace odrazem. Lomený a odražený paprsek svírají pravý úhel [1].

Polarizace při odrazu na kovech

Volné elektrony a vodivost mohou za optické vlastnosti kovů. Například jen u velmi tenkých kovových fólií je pozorovatelný průchod světla. Tloušťka takové fólie se řádově musí rovnat vlnové délce dopadajícího světla. Pro odražený paprsek od kovu zase nelze docílit jeho úplné polarizace. Neplatí pro něj Brewsterův zákon, ať dopadne pod jakýmkoliv úhlem. Obecně tedy platí, že lineárně polarizovaný dopadající paprsek se na kovech odráží polarizován elipticky [2].

Polarizace dvojlomem

Dvojlom nastává pouze u anizotropních látek. U anizotropního prostředí je rychlost šíření závislá na směru. Světlo se tedy šíří v různých směrech různými rychlostmi. Po dopadu nepolarizovaného světla na takovou látku dojde k dvojlomu - rozdělení na dva paprsky. Řádný paprsek se řídí Snellovým zákonem lomu, šíří se stejnou rychlostí nezávisle na směru. Pro mimořádný paprsek je rychlost šíření ovlivněna směrem. Protože se oba paprsky šíří od sebe různou rychlostí platí pro ně různé indexy lomu. Pro oba paprsky ale platí, že jsou lineárně polarizované a jejich elektrické intenzity kmitají v rovinách, které jsou na sebe kolmé. Mezi známé krystaly, které dvojlom vytváří, patří krystal islandského vápence [2].

Polarizace pomocí polarizačních filtrů

Dalším způsobem, jak získat lineárně polarizované světlo, je užití polarizačních filtrů - polaroidů. Jedná se o uměle vytvořený polarizační filtr z látky nazývané herapatit nebo to jsou tenké plastové filmy tvořené rovnoběžně usměrněnými dlouhými uhlovodíkovými řetězci. Herapatit je směs síranu chininu s kyselinou sírovou, jodovodíkovou a jodem. Jedná se o uměle vytvořené mikroskopické krystalky, které jsou vloženy do izotropního prostředí sloužící jako tmelící matrice. Než matrice ztuhne, jsou krystalky orientovány mechanicky nebo elektricky tak, aby osy všech byly orientovány rovnoběžně. Díky této orientaci je světlo, které projde filtrem lineárně polarizováno a ostatní složky elektrické intenzity ležící v jiných rovinách jsou odfiltrovány [2].

3.2 Maxwellovy rovnice

Maxwellovy rovnice jsou soustavou sedmi rovnic (čtyři hlavní a tři vedlejší) popisující elektromagnetické pole. Lze je vyjádřit ve dvou základních formách, a to jako rovnice ve tvaru diferenciálním nebo integrálním. Dále budou uvedeny ve tvaru diferenciálním.

Tab. 1 Diferenciální tvar Maxwellových rovnic elektromagnetického pole [4].

$$\mathbf{rot} \mathbf{H} = \nabla \times \mathbf{H} = \mathbf{i} + \frac{\partial \mathbf{D}}{\partial t} \quad (1.11)$$

$$\mathbf{rot} \mathbf{E} = \nabla \times \mathbf{E} = -\frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t} \quad (1.12)$$

$$\mathbf{div} \mathbf{D} = \nabla \cdot \mathbf{D} = \rho \quad (1.13)$$

$$\mathbf{div} \mathbf{B} = \nabla \cdot \mathbf{B} = 0 \quad (1.14)$$

Maxwellova rovnice (1.11) vyjadřuje, že elektrický proud (pohybující se náboj) je zdrojem elektrického pole. \mathbf{H} je vektor intenzity magnetického pole, vektor \mathbf{i} je označením pro hustotu volných proudů a \mathbf{D} je vektor elektrické indukce.

Obecný zákon elektromagnetické indukce (1.12) vyjadřuje vztah mezi vektorem intenzity elektrického pole \mathbf{E} a vektorem magnetické indukce \mathbf{B} . A říká, že časová změna magnetického pole indukuje pole elektrické.

Rovnice 1.13 je vyjádřením zřídlovosti elektrického pole, kde hustota volných nábojů je označena ρ . A rovnice 1.14 vyjadřuje neexistenci magnetického náboje a popisuje magnetické pole jako nezřídlové. Maxwellovy rovnice jsou uvedeny také v běžně používaném matematickém zápisu s operátorem nabla ∇ [3, 4].

Vedlejší Maxwellovy rovnice jsou uvedeny v tabulce 2. Vztah 1.15 je Ohmovým zákonem v diferenciálním tvaru, kde γ je konstanta měrné vodivosti. A další dvě rovnice představují vztahy mezi vektory \mathbf{D} , \mathbf{E} , \mathbf{H} , \mathbf{B} a materiálovými konstantami, kde permitivita je $\varepsilon = \varepsilon_r \varepsilon_0$ a permeabilita je $\mu = \mu_r \mu_0$ [3, 4].

Tab. 2: Materiálové vztahy - vedlejší Maxwellovy rovnice [4].

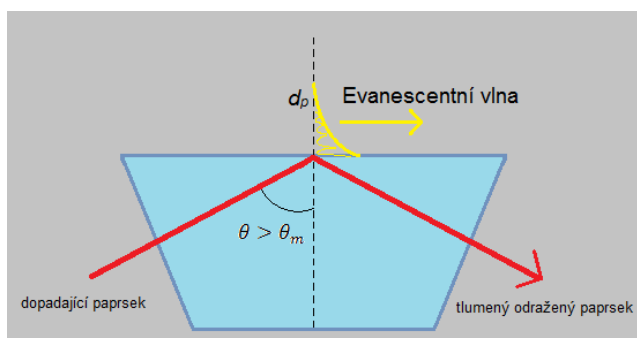
$\mathbf{i} = \gamma \mathbf{E}$	(1.15)
$\mathbf{D} = \varepsilon_r \varepsilon_0 \mathbf{E}$	(1.16)
$\mathbf{B} = \mu_r \mu_0 \mathbf{H}$	(1.17)

3.3 Zeslabený úplný odraz - ATR, evanescentní vlna

ATR (z angl. Attenuated Total Reflectance) je spektroskopická moderní technika, která vychází z principu úplného odrazu světla na rozhraní. Při dopadu světla na rozhraní pod úhly většími než je mezní úhel, dochází k jeho úplnému odrazu a zároveň vzniká za speciálních podmínek evanescentní (tlumená) vlna. Ta zasahuje do opticky řidšího prostředí. Její elektrická intenzita exponenciálně klesá se vzdáleností od rozhraní ve směru osy z , rovnice (1.18).

$$E = E_0 e^{-(z/d_p)} \quad (1.18)$$

Charakteristickým parametrem evanescentní vlny je její hloubka průniku d_p do prostředí. Matematicky lze tuto hloubku vyjádřit jako převrácenou hodnotu komplexní složky k -vektoru ve směru osy y .



Obr. 7: Schéma vzniku evanescentní vlny při ATR.

V závislosti na indexech lomu obou prostředí, na vlnové délce λ použitého záření a úhlu dopadu se tato hloubka řádově pohybuje v rozmezí desítek až stovek nanometrů. Tudíž je úzce vázána k rozhraní a je využita jako vysoce citlivá sonda. Jakákoliv malá změna v indexu lomu prostředí, do kterého evanescentní vlna zasahuje, se projeví ve změně intenzity odraženého paprsku, dochází tedy k jejímu útlumu [6].

$$\frac{1}{ik_y} = d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \sqrt{\left(\sin^2 \theta - \frac{n_2^2}{n_1^2}\right)}} \quad (1.19)$$

3.4 Rezonance povrchových plasmonů - SPR (Surface plasmon resonance)

První zmínky o povrchových plasmonech byly v roce 1902, kdy R. W. Wood pozoroval anomálie ve světelném spektru při difrakci na kovové difrakční mřížce. Později se potvrdilo, že anomálie jsou způsobeny excitací elektromagnetických povrchových vln na povrchu difrakční mřížky [3, 7].

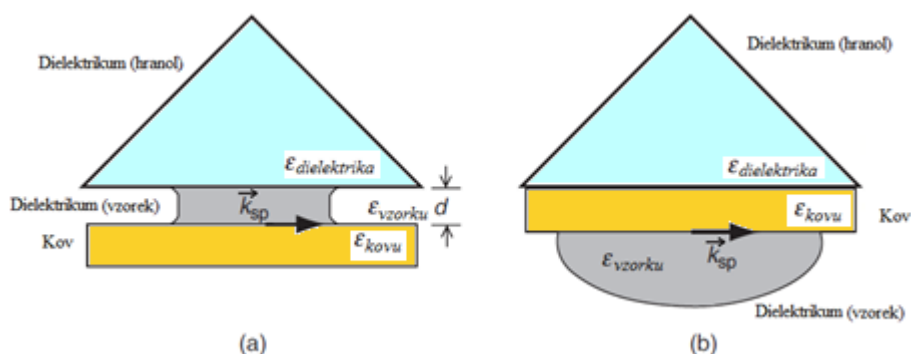
V roce 1968 A. Otto demonstroval, že pokles v reflektivitě při zeslabeném totálním odrazu (ATR) je způsoben excitací povrchových plasmonů [3, 7].

Nejjednodušší uspořádání, ve kterém mohou povrchové plasmony vznikat, se skládá z polonekonečného prostředí kovu a dielektrika v obou případech s komplexní permitivitou. Ta má složku reálnou i imaginární [7].

Resonancí povrchových plasmonů jsou myšleny podélné oscilace volných elektronů přítomných na rozhraní kovu a dielektrika. Jako kvantum těchto oscilací označujeme plasmon. SPR lze vyvolat průchodem elektronu tenkou kovovou vrstvou a dále pak odrazem elektronu nebo také fotonu od této vrstvy [8]. Podmínky vzniku rezonance povrchových plasmonů budou popsány v následující kapitole.

3.4.1 Ottovo a Kretschmannovo uspořádání

Rozlišujeme dvě základní konfigurace pro navedení světla na rozhraní za účelem vzniku SPR. Obě se skládají z ATR hranolu o definovaném indexu lomu a vrcholovém úhlu. Rozdíl v uspořádání jednotlivých komponent je vykreslen na obrázku 8. V případě Ottovy konfigurace se vzorek nachází v gapu mezi krystalem ATR a kovem. Z těchto dvou konfigurací se běžněji využívá Kretschmannova konfigurace, kdy je vzorek v přímém kontaktu pouze s kovovou tenkou vrstvou, která je nadeponována na ATR hranol [3].

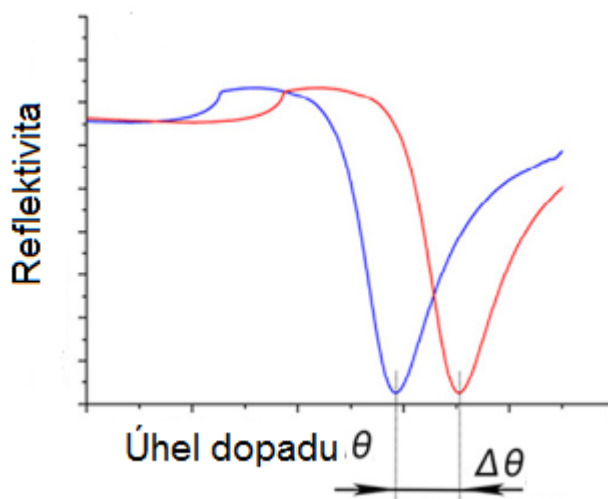


Obr. 8: Ottova konfigurace (a), Kretschmannova konfigurace (b).

3.4.2 Podmínky vzniku SPR

Povrchový plasmon vyvolaný světelným zářením se propaguje podél kovové vrstvy a jeho evanescentní vlna reaguje na vzorek, který je v kontaktu s kovovým filmem. K jeho vyvolání dojde, pokud je vlnový vektor dopadajícího světla roven vlnovému vektoru plasmonu kovu. Pokud je úhlová frekvence elektromagnetického záření ω nižší než plasmonová frekvence daného kovu, tak i toto záření se pak může kovem šířit.

Excitace povrchových plasmonů vyvolává pokles v intenzitě odraženého světla. Tento pokles můžeme pozorovat jako minimum ve vykreslené závislosti úhlu dopadu na reflektivitě, obrázek 9. Úhel dopadu, který se nachází v minimu této závislosti, nazýváme rezonanční úhel [9].



Obr. 9: Závislost reflektivity na úhlu dopadu.

Disperzním vztahem (1.20) je popsána závislost rezonančního úhlu na optických charakteristikách celého systému

$$n_{hranol} \cdot \sin \theta = \sqrt{\frac{\varepsilon^{vzorku} \varepsilon^{kov}}{\varepsilon^{vzorku} + \varepsilon^{kov}}}, \quad (1.20)$$

kde n_{hranol} je index lomu hranolu, θ je úhel dopadu a ε jsou komplexní permitivity pro dielektrikum - vzorek a kov [9].

Reálné složky permitivity dielektrika a kovu musí mít opačná znaménka. Protože permitivita dielektrika bývá kladná, musí mít zápornou permitivitu kov. Mezi takové patří ušlechtilé kovy, jakými jsou zlato, stříbro, hliník nebo měď. V praxi pro využití SPR techniky pro biologické účely je však preferováno zlato díky své stabilitě [7, 9].

Další podmínka je kladena na polarizaci a vlnovou délku použitého záření. Pro buzení SPR je zapotřebí pouze *p*-polarizovaného světla. Vlnová délka světelného zdroje ovlivňuje penetrační hloubku evanescentní vlny. Například pro SPR, kdy se plasmony propagují na rozhraní zlata a dielektrika o indexu lomu 1,32, roste penetrační hloubka, a to v rozmezí 100 - 600 nm při rozsahu vlnových délek od 600 do 1000 nm. Proto se jako zdroj záření využívá červeného až infračerveného záření [7].

3.5 SPRi - Surface plasmon resonance imaging

V současnosti jsou technologie SPR a SPRi velice rozšířené a využívané. Velké uplatnění nachází v klinických diagnostikách pro stanovování přítomnosti alergenů v potravinách, screeningu drog a léčiv, pro monitoring životního prostředí a kontrolu vod. SPRi je vhodnou metodou pro studium interakcí nukleových kyselin, proteinů/DNA nebo interakcí protein/protein [10].

SPRi je optická metoda využívající princip SPR, kde je jako detektor využit CCD snímač (z angl. charged coupled device). CCD prvek zachycuje a zaznamenává intenzitu odraženého světla. V průběhu měření přenáší také obraz v reálném čase a je tedy umožněno sledovat stav povrchu biočipu. Díky této vizualizaci lze získat přehled o tom, zda sledovaná reakce probíhá a odhadem lze stanovit jak intenzivně. Z celého měření nebo jen z určitých částí lze pořizovat snímky a ty mohou být dále podrobeny obrazové analýze. Výstupem měření je senzogram, který je časovým záznamem změn odrazivosti [11, 12].

Pro diagnostiku rakoviny v raném počátečním stádiu se staly mocným nástrojem analytické metody založené na detekci rakovinných biomarkerů. Tyto metody musí být vysoce senzitivní a selektivní. Senzory založené na SPR využívají vazby mezi biomarkerem

v roztoku s receptorem vázaným na povrchu senzoru. Imobilizací receptorů například aptamerů a protilátek na SPR biočip je umožněna selektivní detekce různých proteinových biomarkerů ze sérových vzorků. Biomarkery jsou v počátečních vývinu rakoviny v séru zastoupeny ve velice nízkých koncentracích. A SPR biočipy prokazují vedle selektivity také vysokou citlivost na tyto nízké koncentrace. Různými metodami zesílení SPR signálu bylo dosaženo citlivosti na koncentrace v rozmezí piko (10^{-12}) až zepto (10^{-21}) molů. A proto jsou SPR biočipy slibnou metodou pro klinickou diagnostiku raných fází rakoviny [13].

V práci [13] dokázali detekovat protein kyseliny listové na úrovni femtomolu (10^{-15} mol) díky speciálně upravenému tzv. anti-fouling povrchu biočipu. Tento druh povrchu má zabránit tvorbě nespecifických vazeb. Jejich přístup spočíval v přidání grafenové vrstvy technikou CVD na povrch zlata SPR biočipu. Grafenová vrstva byla dále funkcionalizována receptory kyseliny listové. Demonstrovali také, že samotná kombinace lidského a hovězího sérového albuminu má blokační účinky na tvorbu nespecifických vazeb, když nechali SPR biočip smáčet v roztoku HSA a BSA v poměru 1:1.

SPRi metoda díky možnosti multi-detekce látek bez nutnosti chemického značení a díky získávání dat v reálném čase byla využita také ke studiu pluripotence kmenových buněk [14]. Tím SPRi metoda konkuruje jiným běžně užívaným metodám pro studium kmenových buněk a metodám v regenerační medicíně jakými jsou *in vitro* testy, histochemie, imunofluorescence a molekulární analýzy (cytometrie). Tyto metody jsou často časově náročné a mnohdy neumožní provést kvalitativní i kvantitativní analýzu současně [15]. To také platí pro detekci a analýzu alergenů jako je mléčný kasein [16, 17] nebo ovalbumin [18], kdy výsledky získané metodou SPRi jsou často porovnány a jsou srovnatelné s výsledky získanými z časově náročné ELISA analýzy.

Nejen pro biochemická měření v klinických laboratořích je SPRi technika využívána. V rámci projektu pro ochranu kulturního dědictví bylo pro diagnostiku využito principu SPR. Díky SPR biosenzoru sendvičového typu bylo umožněno identifikovat, zda pro tvorbu díla bylo využito temperových barev s příměsí vaječného bílku či žloutku nebo celého vejce. Ovalbumin byl rekogničním prvkem pro vaječný bílek a imunoglobulin typu Y pro žloutek [19].

3.6 Biosenzor, SPRi biočip

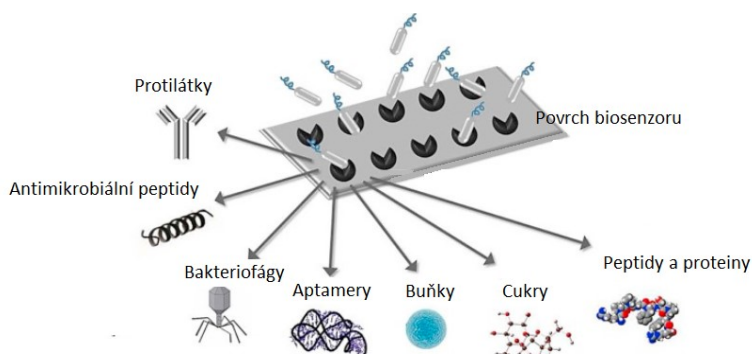
SPRi senzor je v podstatě refraktometr s tenkou vrstvou kovu, který umožňuje měřit změny v indexu lomu. Tyto změny se odehrávají v těsné blízkosti kovové vrstvy, která podporuje vznik povrchového plasmonu [7].

Obecně lze biosenzor definovat jako analytický přístroj, který převádí biologickou odezvu na elektrický signál. Skládá se z biologického prvku a fyzikálně - chemického převodníku. Specifická interakce mezi analytem a biologickým prvkem se projevuje jako fyzikálně - chemická změna, která je pomocí převodníku detekována. Získaný elektronický signál umožňuje nejen látku detekovat, ale také určovat její koncentraci [6, 10].

Výroba biosenzorů včetně SPRi biočipů vyžaduje multidisciplinární znalosti v oblastech chemie, fyziky, biologie a inženýrství. Na biosenzory jsou kladeny vysoké nároky na jejich specifitu, která se odvíjí od fyzikálních parametrů jako je pH a teplota. Dalším požadavkem je, aby biosenzory bylo možné využívat k opakovaným měřením [20].

Obecně bychom mohli látky (ligandy) biosenzorů zodpovědné za biochemickou odezvu rozdělit do tří kategorií na základě jejich mechanismů a to na:

- biokatalytické, kde se využívá především enzymů,
- bioafinitní, kde jsou uplatňovány protilátky a nukleové kyseliny,
- mikrobiální, kde je využito přítomnosti mikroorganismů [20].



Obr. 10: Schematické znázornění možných ligandů pro tvorbu biosenzorů [21].

3.7 Typy biosenzorů

Příprava a aplikace biosenzorů je v dnešní době velice aktivní oblastí výzkumu. A hojně využití nachází pro komerční účely. Své uplatnění našly v širokém poli oblastí přes potravinářský a fermentační průmysl (kontrola kvality a nezávadnosti potravin), medicínu (stanovování přítomnosti látek a jejich kvantitativní analýza), životní prostředí (kvalita pitné vody, přítomnost toxinů), detekce drog, dopingů anebo pro vojenské účely [6].

3.7.1 Enzymové biosenzory

Principem těchto biosenzorů je reakce enzymu a inhibitoru, kdy je měřena aktivita enzymu v přítomnosti nebo naopak nepřítomnosti inhibitoru. Tento přístup je vhodný pro detekci drog a jedovatých sloučenin, jelikož tyto látky působí jako inhibitory pro enzymy. Enzym může být na povrch snímače signálu imobilizován kovalentní nebo iontovou vazbou,

fyzikální adsorpcí (van den Waalsovy síly) nebo kovalentním zesíťováním (z angl. covalent cross-linking) [22].

3.7.2 DNA a RNA biosenzory

Zde je využíváno nukleových kyselin. Jednořetězcová nukleová kyselina je připevněna na substrátu biosenzoru a je schopna rozpoznat a navázat svou komplementární část ze vzorku (analytu). Za tuto interakci zodpovídá vznik stabilní vodíkové vazby mezi řetězcí nukleové kyseliny [20].

Aptamery jsou RNA (ribonukleová kyselina) nebo DNA (2-deoxyribonukleová kyselina) tvořené pouze jedním řetězcem. Jejich afinita a specificita je srovnatelná nebo i lepší než u protilátek. Díky velikosti aptameru, která je 1-2 nm, je umožněno imobilizovat tuto látku ve větších hustotách na povrch biosenzoru. Tímto je docíleno vyšší citlivosti a senzory pak dosahují i nižších mezí detekce [23].

3.7.3 Mikrobiální a tkáňové biosenzory

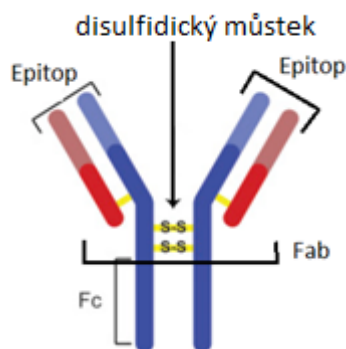
Biochemický prvek tohoto typu senzoru je v aktivním životním stavu. Jedná se o mikrobiální, rostlinné nebo živočišné buňky, kterým je poskytnuto jejich přirozené biologické prostředí. Tímto je příznivě ovlivněna jejich aktivita a stabilita, které určují životnost biosenzoru. Pro imobilizaci těchto biokomponent se využívají speciální techniky. Nejjednodušší je zachycení buněk do pórů membrány, přes kterou je přefiltrujeme. Stabilitu biosenzoru lze připravit zachycením buněk do gelu (kolagen, agar, želatina), kdy však příprava musí dodržovat podmínky pro zachování aktivity buněk. Kovalentní vazba buněk na substrát není vhodná, jelikož často dojde ke zničení buněčné stěny [6].

3.7.4 Imunosenzory

Tyto senzory využívají vysoké afinity protilátek k příslušným antigenům. Protilátky se vážou specificky na patogeny či jiné toxiny a také mohou interagovat se složkami imunitního systému hostitele.

Protilátky (imunoglobuliny - Ig) jsou proteiny produkovány imunitním systémem eukaryotních buněk s účelem neutralizovat či eliminovat patogenní látky. Protilátky (velikost 10-15 nm) mají tvar písmene Y a pro všechny platí stejná stavba ze čtyř řetězců - dva lehké (V_L) a dva těžké (V_H), které jsou spojené disulfidickým můstkem. Podle těžkého řetězce rozlišujeme 5 typů imunoglobulinů, jedná se o IgA, IgD, IgE, IgG a IgM. Protilátku dělíme na dva fragmenty. Jeden je zodpovědný za interakci a aktivaci dalších partnerů imunitního systému a značí se zkratkou F_C . Druhý fragment (F_{ab}), nazývaný také jako epitop, zodpovídá

za rozpoznání a za specifickou vazbu antigenu. Díky této vlastnosti se protilátky staly klíčovými ligandy v oblasti potravinářského průmyslu a hlavně v klinických výzkumech [21].



Obr. 11: Schéma protilátky s vyznačenými fragmenty a dvěma lehkými řetězci (červené) a dvěma těžkými řetězci (modré) [23].

3.8 Povrchová chemie

Povrchovou chemií se myslí chemicky aktivní vrstva, která se nachází na zlatém povrchu biočipu. Biomolekuly, které by byly totiž vhodnou volbou pro specifickou reakci s analyzovanou látkou, nevytváří na inertním zlatě dostatečně pevnou vazbu. Proto se využívá povrchové chemie, která slouží jako mezičlánek mezi zlatou vrstvou a biomolekulami sloužícími jako rekogniční prvek (ligand). Povrchová chemie vytváří se zlatem dostatečně silnou a spolehlivou vazbu a zároveň umožňuje biočip funkcionalizovat požadovanými ligandy, kterými mohou být proteiny, protilátky, nukleové kyseliny nebo řetězce DNA a RNA. Kdy mezi ligandem a povrchovou chemií dochází ke vzniku pevné kovalentní vazby [24, 25].

Povrchová chemie sice zajistí pevnou vazbu s navázaným ligandem, zároveň však způsobuje, že se na ni lehce zachytí i jiné molekuly přítomné v analyzovaném médiu. Biosenzory SPR mají různá omezení a právě jedním z nich je nežádoucí povrchové znečištění biočipu molekulami z reálných vzorků. Povrchové znečištění ovlivňuje citlivost biosenzoru tím, že blokuje imobilizaci analytu a tím tvorbu specifické vazby s rozpoznávacími prvky na biosenzoru. Dochází poté ke snížení citlivosti nebo naopak k falešným pozitivním odezvám [26].

Proto se současný výzkum zabývá studiem a tvorbou tzv. antifouling povrchů, volně přeloženo jako neznečišťující se povrchy. Takový antifouling povrch může být vytvořen například díky molekulárnímu uspořádání; SAM (self-assembled mono/multilayer) architekturou; povrchovým nábojem vrstvy; molekulární hydrofobicitou a vliv může mít i tloušťka vrstvy nebo její hustota. Mezi látky, které jsou pro tvorbu antifouling povrchů

vhodné, patří například povrchové chemie ze zwitterionických sloučenin, PEG/OEG materiály nebo materiály na bázi polysacharidů [26].

Zwitterionické sloučeniny nebo také zwiteriony je označení pro dipolární ionty. Molekula vykazuje neutrální celkový náboj, ale uvnitř má jednotkové náboje s opačným znaménkem na opačných stranách molekuly [27].

3.9 Albuminy

Slovo albumin pochází z latinského výrazu „albus“, který znamená bílý. Známým faktem je, že albumin se ve velkém množství nachází také ve vaječném bílku. Jedná se o rozpustný protein, který je u všech obratlovců zastoupen nejhojněji a v krevní plasmě má vedoucí úlohu. Albuminy se řadí mezi nejvíce prozkoumané proteiny, a proto jsou často využívány v základním výzkumu a klinické praxi. Právě sérový albumin se stal oblíbeným modelovým proteinem pro studium chemie proteinů [28, 29].

Lidský sérový albumin (HSA – human serum albumin) je hlavním proteinem krve. Tvoří 60 % všech plasmatických proteinů a jeho normální koncentrace se pohybuje okolo 42 g/l. Protein albuminu se skládá z 585 aminokyselin a jeho molekulová hmotnost je 66 437 Da (spočteno na základě složení z aminokyselin). Molekulová hmotnost komerčně připravovaného HSA se pohybuje od 66 437 Da do 66 600 Da dle post-translačních modifikací [30, 31].

Albumin je produkován jaterními buňkami a je jednou z hlavních bílkovin, která udržuje osmotický tlak krve. Albumin je dále velice důležitým transportním proteinem. Díky vazby na tento protein jsou mastné kyseliny, aminokyseliny, steroidní hormony, některé těžké kovy a také řada léků a vitamínů distribuovány v těle [31].

Kromě přítomnosti ve vaskulárním systému se albumin nachází v lymfatickém systému a dále pak v malém množství také v kůži. Člověk v klidovém režimu denně vyloučí 4-12 mg v moči [29, 32].

Stanovení HSA je běžným úkonem v klinických biochemických laboratořích. HSA je charakteristickým proteinem při diagnóze nefrotického syndromu či diabetické nefropatie (onemocnění ledvin), který se projevuje albuminurií nebo hypoalbuminemií, tedy vysokým výskytem albuminu v moči. Při podezření na tuto diagnózu probíhá u pacienta 24 hodinový screening moči, kde je sledována přítomnost albuminu v moči. Při microalbuminurii (reverzibilní projev diabetické nefropatie) se hodnota albuminu pohybuje 30-300 mg v denní moči [28, 33].

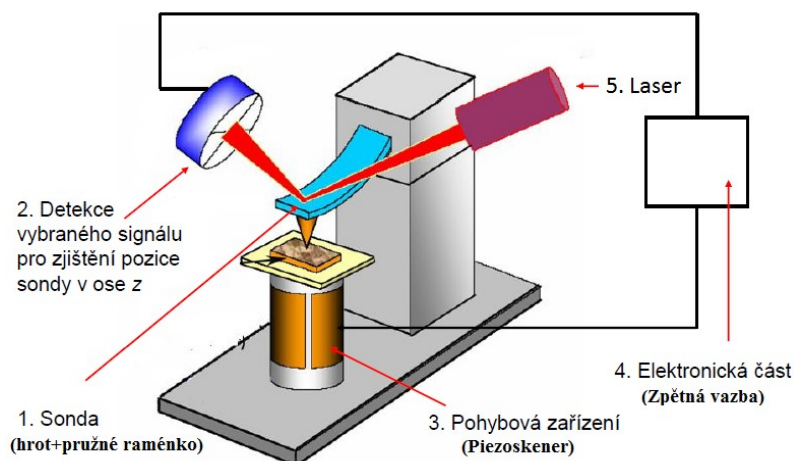
Dále je albumin stanovován z krevní plasmy, kdy snížená koncentrace tohoto proteinu může být prognózou karcinomu žaludku, tlustého střeva či jícnu. V klinickém výzkumu je tedy značný zájem o detekci albuminu ze séra (plasmy) a z moči [29].

3.10 Metoda AFM

Tato část se bude stručně zabývat metodou AFM, která byla v rámci experimentu SPRI využita. Pomocí metody AFM byly určeny parametry drsnosti povrchu biočipu SPRI, a proto jsou zde nastíněny principy této zobrazovací techniky.

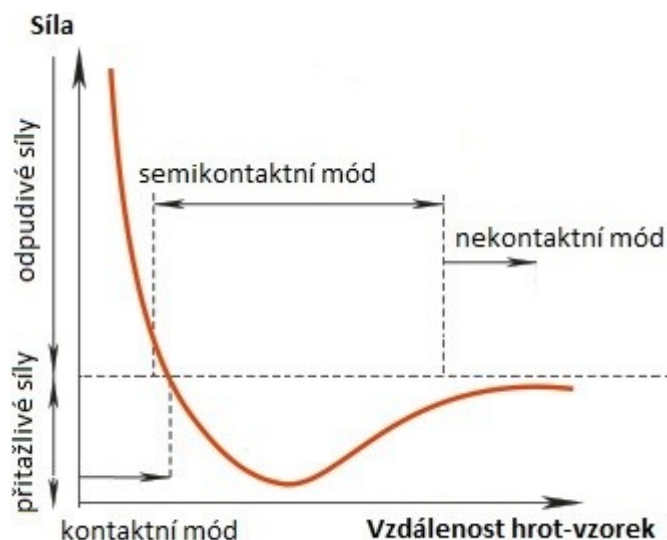
Mikroskopie atomárních sil - AFM (Atomic force microscopy) je metoda, která umožňuje charakterizovat povrch látky s rozlišením na atomární úrovni. AFM společně s STM (skenovací tunelová mikroskopie) jsou nazývány jako mikroskopie skenovací sondou. Obě metody využívají tzv. sond. Sonda se skládá ze základny, raménka a ostrého, tenkého hrotu. Hrot (zakončen ideálně jedním atomem) se pohybuje v těsné blízkosti povrchu zkoumaného vzorku v závislosti na použitém módu. STM využívá měření tunelového jevu, který vzniká mezi hrotem a vzorkem. Zde je STM metoda omezena pouze na vodivé vzorky oproti AFM [34, 35].

Hrot využívaný pro AFM se nachází na volném konci pohyblivého raménka. AFM využívá mechanické odezvy, tedy snímání pohybu raménka v důsledku působení sil mezi povrchem a hrotem. AFM využívá dvou režimů: statického (DC) a dynamického (AC). Během DC techniky dochází k mechanické odezvě, která je jednoduše způsobena vychýlením raménka vlivem síly mezi hrotem a vzorkem. U AC technik raménko osciluje s určitou frekvencí a mechanická odezva je zjištěna ze změny amplitudy, frekvence či fáze z důsledku interakce hrotu a vzorku [34, 35].



Obr. 12: Schéma AFM systému [34].

Metoda AFM nabízí různé módy měření: kontaktní, semikontaktní a bezkontaktní. Interakce a síly projevující se mezi hrotem a vzorkem jsou zobrazeny na obrázku 13 [34, 35].



Obr. 13: Síly působící mezi povrchem vzorku a AFM hrotem s přiřazenými módy techniky [36].

Semikontaktní mód AFM

Semikontaktní mód nebo někdy nazýván jako poklepový je kombinací kontaktního a bezkontaktního režimu. Hrot na konci raménka přichází do kontaktu s povrchem vzorku jen v určitých intervalech. Tento režim byl vyvinut za účelem zvýšení rozlišení a pro snížení zkreslení signálů laterálními silami. Při skenování raménko s hrotem osciluje s určitou frekvencí (amplitudou a fází). Při měření na hrot působí přitažlivé i odpudivé síly a při přiblížení hrotu k povrchu vzorku dochází ke změně amplitudy a k fázovému posuvu. Tento režim je vhodný k měření měkkých vzorků jako například polymerů, biologických preparátů a kompozitů [34, 35].

3.10.1 Parametry drsnosti:

Ra - Tento parametr drsnosti udává střední odchylku výšek nerovnosti v ose z . Kde \bar{z} je střední výška vzorku v ose z , která je vypočtena jako aritmetický průměr všech naměřených hodnot výšky z_n . Kde n nabývá hodnot 1 až N .

$$R_a = \frac{\sum_{n=1}^n |z_n - \bar{z}|}{n} \quad (1.21)$$

Hodnota tohoto parametru je vždy kladná a je menší nebo rovna parametru R_{MS} [37].

R_{MS} - Zkratka R_{MS} z angličtiny Root mean square je v češtině vyjádření kvadratického průměru. Ten můžeme spočítat dle vzorce (1.22), kde n vyjadřuje počet prvků.

$$x_k = \sqrt{\frac{x_1^2 + x_2^2 + \dots + x_n^2}{n}} \quad (1.22)$$

Parametr drsnosti označován jako R_{MS} je střední kvadratická odchylka vyjádřena vzorcem (1.23).

$$R_{MS} = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^n (z_n - \bar{z})^2}{n}} \quad (1.23)$$

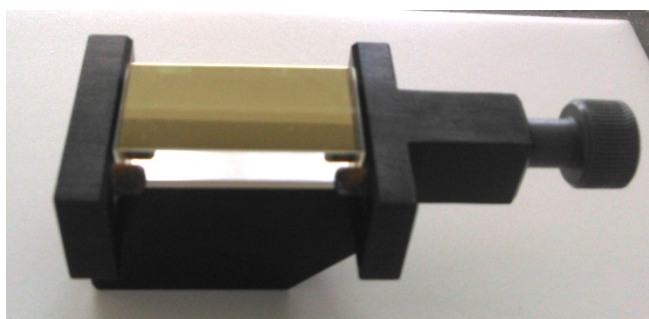
Hodnota tohoto parametru je vždy větší než Ra, protože je citlivější na velké odchylky od \bar{z} , protože ty nabývají po umocnění větší váhy [37].

3.11 Biočipy použité pro experiment

SPRi biočipy použité pro vlastní experiment byly zakoupeny u firmy Horiba. Firma je dodává v různých provedeních. Pro experiment byly použity biočipy v Kratschmannově konfiguraci. Dodané biočipy byly připraveny pro konečnou funkcionalizaci dle vlastních požadavků.

Výchozími biočipy byly optické hranoly s vysokým indexem lomu s již nadeponovanou 50 nm tenkou zlatou vrstvou, obrázek 14. Oba biočipy měly stejnou povrchovou chemii, tu tvořily CO skupiny. Sériové označení biočipů bylo 3385 a 3889 a firma je vyrobila v listopadu 2015. Poté byly skladovány v lednici při 4-6 °C.

Dodané biočipy jsem dále funkcionalizovala pro detekci a stanovení různých typů albuminů. Postup je popsán v praktické části této práce.



Obr. 14: SPRi biočip firmy Horiba umístěný v držáku.

3.12 Použité chemikálie

Pro funkcionalizaci zakoupených biočipů byly použity antigeny uvedené v tabulce 3. Místo originálního názvu budu v této práci dále uvádět vlastní pracovní názvy. Pro účel negativní kontroly byly nanесeny spoty myšího imunoglobulinu typu G - IgG. Smícháním 8 µl HSA 8260 spolu s 0,5 µl 99 % formaldehydem, byl připraven roztok pro otestování vlivu formaldehydu na bioaktivitu proteinu HSA. Pro omytí povrchu naspotovaného biočipu byl použit 2-ethanolamin hydrochlorid, který slouží k odstranění nenavázaných proteinů.

Tab. 3: Seznam antigenů použitých pro spotování biočipu.

Pracovní název	Originální název
HSA 11	Monoclonal anti-albumin antibody produced in mouse, clone HSA 11
Anti-Bovine	Monoclonal anti-bovine serum albumin antibody produced in mouse, clone BSA-33
Anti-Chicken	Monoclonal anti-chicken egg albumin (ovalbumin) antibody produced in mouse, clone OVA-14
HSA8260	Mouse anti-human serum albumin, HSA 8260

Jako analyty sloužily pro experiment roztoky albuminů z různých zvířecích druhů a jejich výčet uvádím v tabulce 4. Všechny druhy albuminů byly dodány v práškové formě. Pufrovaný fyziologický roztok PBS (Phosphate buffer solution) o koncentraci 10 M byl použit jako pufr. Pro kalibraci měřicího přístroje SPRi-Lab+ byl použit PBS o koncentraci 12,5 M. Pro regeneraci biočipu byl použit glycin - hydrochlorid o koncentraci 1 mmol/l (dále jen glycin). Sumární vzorec glycinu je $C_2H_5NO_2 \cdot HCl$.

Tab. 4: Seznam analyzovaných albuminů.

Český název	Anglický název	Molární hmotnost kDa
Albumin vaječného bílku	Albumin from Chicken egg white	45 [38]
Albumin z hovězího séra	Albumin from bovine serum	66,4 [39]
Albumin z krysího séra	Albumin from rat serum	65 [40]
Albumin z vepřového séra	Albumin from porcine serum	69,4 [41]
Albumin z ovčího séra	Albumin from sheep serum	66 [42]

Měřicí aparatura byla čištěna roztokem SDS (sodium dodecyl sulfát). Aparatura pro spotování byla čištěna 10% roztokem ethanolu. Pro přípravu roztoků a vzorků, ale také

při čištění biočipu byla používána pouze demineralizovaná voda. Všechny použité chemikálie byly zakoupeny u společnosti SIGMA-ALDRICH.

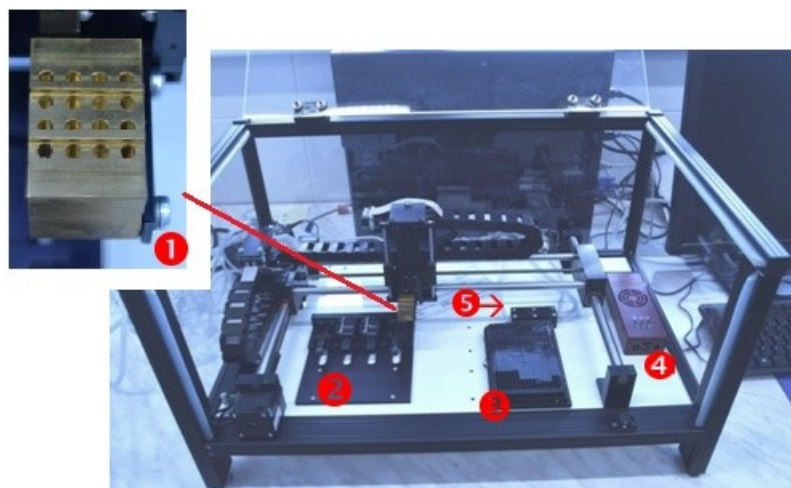
3.13 Aparatura pro nanášení antigenů na biočip SPRi

Pro funkcionalizaci povrchu biočipu jsem využila spotovací přístroj SPRi-Arrayer společnosti HORIBA. SPRi-Arrayer je automatický přístroj, který umožňuje spotovat (tisknout) nejrůznější biolátky jako například proteiny, bakteriální kolonie, DNA a jiné na povrch SPRi biočipu, na sklo, zlato nebo membránové povrchy [43].

Aparatura SPRi-Arrayer je tvořena z několika komponent:

- nanášecí hlava s pinem,
- zásobník nanášené látky,
- držák pro umístění biočipů,
- kompresor,
- posuvný mechanismus;
- zvlhčovač vzduchu.

Jelikož samotný spotovací proces je plně automatický, jsou vstupy, počáteční nastavení a ovládání řízeny počítačovým softwarem dodávaným společností Horiba.



Obr. 15: SPRi-Arrayer. 1 - nanášecí hlava s otvory pro umístění pinu, 2 - držák biočipu a sklíček na prespotting, 3 - zásobník, 4 - zvlhčovač vzduchu, 5 - čistící otvory

3.13.1 Princip nanášení spotu

Požadavky na spotovací aparaturu jsou takové, aby byla vytvořena matice spotů se stejnou distribucí velikosti spotů a zároveň, aby nedošlo k poškození povrchu biočipu

při nanášení. Tyto požadavky jsou splněny díky důmyslnému mechanismu fungování nanášecí hlavy a pinu.

Pin je keramická kapilára, která je za účelem mechanické ochrany, obalená kovovým pouzdrem. Látka, kterou chceme nanést, musí být kapalná, aby došlo ke smáčení stěn kapiláry. Díky kapilárním jevům dojde k nasátí látky do kapiláry. Množství látky, které se dostane do kapiláry, závisí na průměru kapiláry. Další vliv na jejím množství v kapiláře má materiál kapiláry a také hustota s povrchovým napětím látky určené k nanesení.



Obr. 16: Keramický pin v kovovém pouzdře [43].

Kontaktem pinu s povrchem biočipu dojde k uvolnění látky z pinu a vznikne spot. Jeho velikost je ovlivněna právě průměrem použité kapiláry. Ideálně by mělo dojít k uvolnění vždy stejného množství látky z pinu pro danou látku, pin a smáčený povrch. Tímto by měla být zajištěna jednotnost ve velikosti spotů.

Pin je volně umístěn v otvoru nanášecí hlavy. Díky tomuto volnému umístění je zajištěn vertikální pohyb pinu při kontaktu. Na povrch biočipu tedy není kladena větší síla než je síla odpovídající samotné hmotnosti pinu. Tento druh kontaktu umožní bezpečné nanesení spotu bez poškození povrchu biočipu.

Pin je látkou, určenou k nanesení, smáčen také z vnější strany. Aby byla tato kapalina ze stěny odstraněna, tak před samotným spotováním na biočip dochází k prespottingu. To znamená, že pin vytvoří kontakt nanečisto na prespotovací sklíčko. Dojde k přenesení kapaliny z vnitřní ale i vnější stěny kapiláry na sklíčko. Následně je spotován biočip a je zajištěno, že spot bude tvořit jen kapalina uvolněná zevnitř kapiláry.

3.13.2 Spotovací cyklus

Cyklus spotování se skládá ze dvou fází: tvorby spotu a čištění pinu. Ze zásobníku je pomocí kapilárních sil nabrána požadovaná látka do pinu. Proběhne prespotting na sklíčko a poté pin kontaktem s povrchem biočipu vytvoří spot případně požadovaný počet spotů z dané látky.

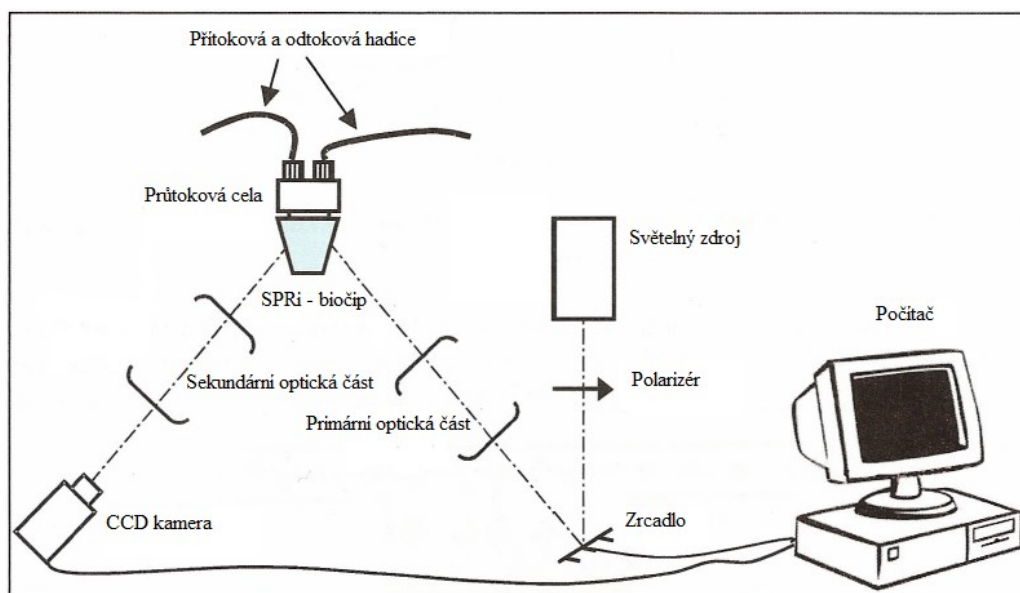
Fáze čištění pinu předchází vždy před spotováním nové látky ze zásobníku. Pin je po vytvoření spotu/spotů přesunut a vložen do otvoru, kde se nachází roztok ethanolu.

Zde je omyt proudem tohoto roztoku a následně je osušen kompresorem, který tlakem odsává vzduch a přítomnou kapalinu z pinu.

Aby bylo zabráněno rychlému vypařování tak malého objemu biochemikálií (10 μ l) ze zásobníku, je v aparatuře po celou dobu spotování udržována vlhkost vzduchu zvlhčovačem. Optimální je udržovat vlhkost na 70 - 80 %.

3.14 Aparatura pro měření metodou SPRi

Aparatura pro biochemická měření metodou SPRi je od společnosti HORIBA a nese označení GenOptics SPRi-Lab⁺. Schéma přístroje je zobrazeno na obrázku 17. Skládá se ze dvou hlavních částí: opto-mechanické a průtokové. Naměřená data jsou ukládána a zobrazována na připojeném počítači.



Obr. 17: Schematické znázornění měřicí aparatury GenOptics SPRi-Lab⁺ [27].

Celá opto-mechanická část je uložena v uzavřeném ochranném krytu po celou dobu měření, aby byla chráněna před okolním světlem.

Měřicí aparatura se skládá ze:

- světelného zdroje: laserová LED dioda, $\lambda = 810$ nm,
- polarizéru, dle polohy P1 a P2 je nastavena *p*- a *s*- polarizace,
- zrcadla, umožňuje jemné doladění dopadajícího paprsku pomocí počítače,
- primární optické části, kde je dopadající paprsek na hranol kolimován,
- průtokové cely, na kterou doléhá SPRi biočip díky upínací rukojeti,
- sekundární optické části, vybavené filtrem pro CCD kameru pro lepší obraz,
- CCD kamery.

Průtoková část aparatury je tvořena systémem přístrojů, které jsou propojeny chemicky stálými hadičkami. Skládá se z:

- degaséru, přes který je zajištěno odplynění proudící kapaliny,
- peristaltické pumpy, zajišťuje svým pohybem průtok kapaliny celým systémem, rychlost průtoku je nastavitelná,
- polohovacího ventilu, změnou jeho polohy dochází k zavedení vzorku z 200 μ l smyčky do měřicí cely,
- průtokové měřicí cely, kde dochází k průtoku vzorků a použitých kapalin přes povrch biočipu,
- odpadní kádinky, kde se odplaví veškerá kapalina po průchodu průtokovou celou.

3.15 Průběh měření metodou SPRi

Před sérií vlastních měření na přístroji SPRi-LAB⁺ je nutné provést čištění aparatury. Po zavedení biočipu do aparatury nastává definování masky biočipu a kalibrace přístroje. Následuje popis jednotlivých kroků.

3.15.1 Čištění

Proces trvá přibližně 40 minut, kdy je aparatura promývána roztokem SDS. Ten zaručí, že průtokové hadičky a mechanismus nejsou ucpány nečistotami z předchozích měření a dochází také k očištění smáčených stěn. Po dobu čištění se v měřicí cele nachází provizorní skleněný hranol a nikoliv biočip určený pro analýzu. Během dalších 40 minut je aparatura promývána demineralizovanou vodou. A následně je systém zaplaven pracovním roztokem PBS.

Jakmile je pufovací roztok v aparatuře, může být do průtokové cely umístěn biočip určený k měření. Ve fázi vkládání je průtok zastaven. Při opětovném spuštění průtoku je nutné sledovat, zda nedošlo k zachycení vzduchové bubliny na povrchu biočipu. Povrch biočipu v průtokové cele je umožněno sledovat díky CCD kamery. Přítomnost vzduchových bublin je nežádoucí z důvodu znehodnocení měřených dat a částečně také povrchové chemie. Aby došlo k zaplavení průtokové cely bez vzduchových bublin, je průtoková rychlost po umístění biočipu vyšší.

3.15.2 Definování masky biočipu

Maska biočipu se definuje již při pracovní průtokové rychlosti 50 μ l/min. Nastavení se provádí v programu SPRi Viewer. V této části software provádí snímky biočipu a uživatel vybere nejlépe kontrastní snímek. Dále je umožněno automaticky nebo manuálně definovat

spoty na biočipu. Následně jsou očíslovány a k číslům uživatel připiše názvy použitých látek. Tímto je zajištěna přehlednost v budoucích datech.

3.15.3 Kalibrace

Při kalibraci je nejdříve zjištěn pracovní úhel měření. Je provedeno celkem 100 snímků biočipu v rozmezí úhlů $53,5^\circ$ až $63,5^\circ$, kdy je současně změřena závislost reflektivity na úhlu dopadu. Pracovní úhel není shodný s úhlem rezonančním, ale odpovídá úhlu největší změny reflektivity. Rezonanční úhel se nachází v minimu závislosti reflektivity na úhlu dopadu a pracovní úhel je získán derivací této závislosti. Základní signál odpovídá přítomnosti pufovacího roztoku 10 M PBS a tento signál se kalibruje pomocí 12,5 M PBS. Kalibraci je ukončeno počáteční nastavení přístroje a může nastat vlastní měření.

3.15.4 Cyklus měření koncentrace vzorku

Měření probíhá za konstantní pracovní rychlosti 50 $\mu\text{l}/\text{min}$, při konstantním pracovním úhlu dopadu a vzorek má vždy stejný objem - 200 μl . Tento objem je zajištěn dávkovací smyčkou, která větší objem kapaliny nepojme a je vždy naplněna celá. Jakýkoliv přebytek je odveden do odpadní kádinky. Snadným výpočtem lze odvodit, že vyprázdnění dávkovací smyčky při průtokové rychlosti 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ trvá 4 minuty.

Průběh měření lze rozdělit na 4 fáze.

1. Regenerace

Regeneračním roztokem je glycin. Ten zajistí přerušení vazeb mezi vzorkem a povrchem biočipu. Regeneruje biočip a zbavuje jej nečistot a látek z předchozího měření.

2. Zaplavení PBS

Glycin je do systému nastříknut dávkovací smyčkou a je tedy po 4 minutách vymýván přílivem PBS. Pufovací roztok protéká cca 10-16 minut za účelem ustálení signálu.

3. Vstřík vzorku

Následuje vstřík vzorku opět přes dávkovací smyčku a po dobu 4 minut smáčí povrch biočipu. Dochází k tvorbě specifických vazeb a tím ke změně signálu.

4. Ustálení PBS

Pro ustálení signálu získaného z reakce biočipu na vzorek je 16 minut povrch smáčen roztokem PBS. Pufr smývá slabě vázané či nenavázané části vzorku. Jelikož by omytí biočipu od vzorku pomocí PBS trvalo velice dlouho, dochází k nástřiku roztoku glycinu a krok 1 se opakuje.

4 Praktická část

V této části práce bude popsáno spotování SPRi biočipu, vlastní experiment a budou představeny jeho výsledky. Dále zde budou uvedeny výsledky z charakterizace povrchu biočipu pomocí metody AFM.

4.1 Návrh vlastního experimentu

Hlavní myšlenka celého experimentu navazuje na mou bakalářskou práci [12] a na práci Vojtěcha Ševčáka [44]. Oba jsme se zabývali detekcí nízkých koncentrací albuminu v připraveném roztoku pomocí metody SPRi. Ve své bakalářské práci jsem vlivem hydratace a skladováním biočipu na mokro dokázala udržet stálou odezvu biočipu na nízké koncentrace až po dobu 14 dní. U Ševčáka byla ověřena schopnost metody SPRi detekce albuminu o koncentraci setiny miligramu v litru. U obou prací byl nastíněn princip a požadavky na negativní kontrolu.

Charakteristika negativní kontroly je taková, že se jedná o látku, která má podobné fyzikální vlastnosti (např. molekulová hmotnost) jako antigen zodpovědný za specifickou odezvu. Avšak vůči analyzované protilátce by měla být nereaktivní a neměla by ji na sebe vázat. Její funkcí je reagovat na vlivy teploty anebo na nečistoty vzorku stejně jako antigen. Aby následně mohl být signál negativní kontroly odečten od signálu antigenu a výsledek odpovídal pouze specifické odezvě.

Navržený experiment je zaměřen na hledání látky, která by mohla být vhodnější pro použití jako negativní kontrola. Mezi běžně používanou negativní kontrolu v oblasti imunochemických analýz patří myší imunoglobulin typu G - IgG. Napadlo mne pokusit se najít vhodnou látku sledováním odezvy několika jiných druhů antigenů. Proto byly naspotovány na biočip a jejich výčet je uveden v tabulce 5 a 6. Volba právě těchto látek spočívala v jejich dostupnosti pro laboratorní účely.

Dalším z dílčích experimentů bylo sledovat odezvu biochemicky narušeného antigenu. Narušení by mělo zajistit navázání formaldehydu na molekulu antigenu. Takto biochemicky porušená aktivita proteinu by mohla být možnou cestou pro nalezení vhodné negativní kontroly. Tento pokus je v předkládané práci také proveden. Autorem této myšlenky je Ing. Radek Svoboda, současný student doktorského studia na VŠB-TUO.

Mezi přednosti SPRi metody patří také možnost sledovat či analyzovat více látek pomocí jednoho vhodně připraveného biočipu. Při této příležitosti jsem sledovala, zda dochází ke cross-reaktivitě (specifická odezva) protilátek a nanesených antigenů na biočipu. Jako protilátky jsem zvolila různé zvířecí sérové albuminy, které jsou v klinické praxi běžně využívány.

Experiment tedy spočíval ve sledování odezvy nanesených antigenů na různé zvířecí sérové albuminy o nízkých koncentracích. A výsledky z měření jsou diskutovány v této práci.

4.2 Výroba SPRi biočipu

V rámci experimentu byly připraveny celkem dva SPRi biočipy. Pro konečnou funkcionalizaci biočipů jsem využila přístroj SPRi-Arrayer společnosti Horiba. Jedná se o zařízení, které umožňuje nanášet spoty na zlatý povrch SPRi biočipu. Látky, které byly na zlatý povrch biočipu nanесeny jsou uvedeny v tabulce 5 a 6. Povrchová chemie použitých biočipů byla složena ze skupin CO. Rozložení spotů jednotlivých antigenů odpovídá schématu masky, které je načrtnuto na obrázku 18. Umístění jednotlivých látek bylo navrženo tak, aby vždy jedna látka měla zastoupení na několika různých místech na povrchu biočipu.

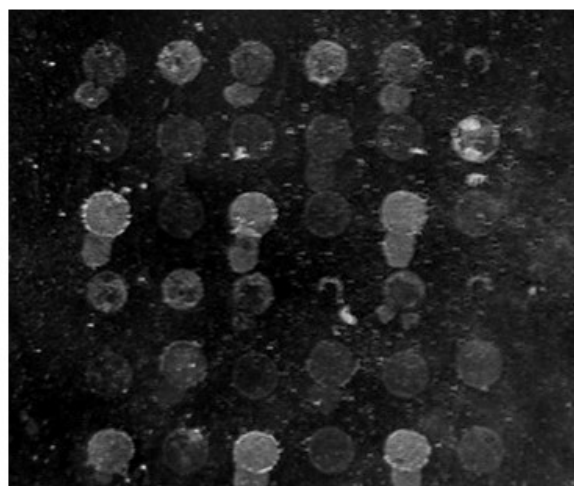
Pro spotování byl použit spotovací pin o průměru 500 μm . A při procesu výroby byla udržována vlhkost ve spotovací aparatuře na 80 %. Antigeny byly pomocí mikropipety umístěny do mikro-jamek zásobníku vždy o objemu 10 μl . Softwarově byl SPRi-Arrayer nastaven tak, aby z jednoho nabrání látky ze zásobníku byly pinem provedeny 3 spoty. Poté následovalo čištění pinu a mohla být nanесena další látka.

Po naspotování byl biočip uložen do zkumavky, ve které se nacházel vodou navlhčený ubrousek. Tak byla zajištěna 100% vlhkost v uzavřeném prostředí zkumavky, aby nanесené proteiny vytvořily s povrchovou chemií biočipu pevné vazby. Takto byl biočip uložen přes noc. Za účelem omytí nenavázaných molekul a ustálení aktivních vazeb povrchové chemie biočipu se používá roztok ethanolaminu s kyselinou chlorovodíkovou o celkové hodnotě pH 9. Biočip byl umístěn do kádinky s tímto roztokem a v třepačce po dobu 15 minut byl povrch důkladně omýván přelévající se hladinou roztoku ethanolaminu. Po vytažení z této omývací lázně byl biočip následně omyt proudem demineralizované vody a proudem vzduchu ze stříčky osušen. Biočip byl poté připraven k měření.

Tab. 5: Seznam použitých antigenů pro spotování biočipů 3389.

Značení pro masku	Pracovní název	Originální název na obale
1	IgG	IgG from murine serum
2	HSA 11	Monoclonal anti-albumin antibody produced on mouse, clone HSA-11, ascites fluid
3	Anti-Bovine	Monoclonal Anti-BovineSerum albumin antibody produced in mouse, clone BSA-33, ascites fluid
4	Anti- Chicken	Monoclonal Anti-ChickenEgg Albumin (Ovalbumin) antibody produced in mouse, clone OVA-14, ascites fluid
5	HSA8260	Mouse Anti HumanSerum Albumin (for research only), 8260-0025
6	HSA8260+formaldehyd	Připraveno smícháním 8 µl HSA 8260 spolu s 0,5 µl formaldehydu

5	6	5	6	5	6
3	4	3	4	3	4
1	2	1	2	1	2
5	6	5	6	5	6
3	4	3	4	3	4
1	2	1	2	1	2



Obr. 18: Vlevo se nachází schéma masky a jednotlivá čísla odpovídají daným látkám dle tabulky výše. Vpravo vidíme snímek reálného povrchu naspotovaného biočipu 3389 při prvním vložení do měřicí aparatury (pořízeno CCD kamerou).

4.2.1 Diskuze a zhodnocení připravených SPRI biočipů

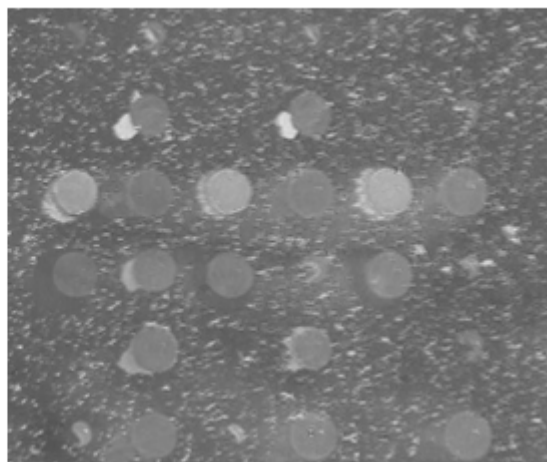
Finální výsledek spotování je v našem případě možno vidět vždy až po vložení biočipu do měřicí aparatury, kde je povrch biočipu snímán CCD kamerou. Při nanesení látky, dochází k jejímu okamžitému zaschnutí na povrchu a vytvoří jen tenký film - spot, který je pouhým okem těžce viditelný.

Z uvedených snímků lze posoudit, že ne všechny spoty jsou ideální. Tvar a velikost spotů nejsou stejné. Ze snímků lze pozorovat, že některé spoty jsou rozteklé jako například spoty IgG, Anti-Chicken, HSA8260 na biočip 3389. Některé jsou velice slabě viditelné (biočip 3389 - spoty Anti-Bovine) anebo nejsou vůbec natištěné (biočip 3385 - spoty IgG, Anti-Chicken a Anti-Bovine).

Tab. 6: Seznam použitých proteinů pro spotování biočipu 3385

Značení pro masku	Pracovní název	Originální název na obale
1	IgG	IgG from murine serum
2	HSA 11	Monoclonal anti-albumin antibody produced on mouse, clone HSA-11, ascites fluid
3	Anti- Chicken	Monoclonal Anti-Chicken Egg Albumin (Ovalbumin) antibody produced in mouse, clone OVA-14, ascites fluid
4	HSA8260	Mouse Anti Human Serum Albumin (for research only), 8260-0025
5	Anti-Bovine	Monoclonal Anti-Bovine Serum albumin antibody produced in mouse, clone BSA-33, ascites fluid

5	3	5	3	5	3
3	4	3	4	3	4
1	2	1	2	1	2
5	3	5	3	5	3
3	4	3	4	3	4
1	2	1	2	1	2



Obr. 19: Vlevo se nachází schéma masky a jednotlivá čísla odpovídají daným látkám dle tabulky 4. Vpravo vidíme snímek reálného povrchu naspotovaného biočipu 3385 při prvním vložení do měřicí aparatury (pořízeno CCD kamerou).

K roztečení spotů mohlo dojít kvůli dopadu kapek vysrážené vody ve zkumavce, kde byl biočip přes noc uložen. Zkumavka, ve které je až 100% vlhkost vzduchu, se po stěnách orosí vodou a ty pak mohou dopadat na povrch biočipu.

Některé spoty vytvořily opravdu tenký film, který jde vidět velice slabě. Mohlo dojít k odstranění velkého množství slabě navázaných molekul proteinu během procesu omývání v ethanolaminové lázni. U biočipu 3385 nedošlo hned u tří látek k jejich natištění na povrch biočipu. K tomu mohlo dojít nedokonalým nanesením z pinu při spotovacím procesu. A další příčinou mohlo být špatné zavedení výchozích látek do jamek dávkovacího zásobníku. Mohlo dojít k nedokonalému smočení dnu jamky a tím nemohla látka vniknout do pinu.

Také lze zvážit, zda zvolená povrchová chemie biočipu byla vhodná pro nanesení daných druhů antigenů. I přes konečný výsledek spotování byla na obou biočipech provedena série měření.

4.3 Vlastní měření

Před samotným měřením byly připraveny vzorky albuminů. Navážky 10 mg každého albuminu byly provedeny na analytických váhách s přesností na čtyři desetinná místa. Následně byla navážka smíchána v 1 000 µl roztoku PBS o koncentraci 10 M. Takto byly připraveny výchozí vzorky o koncentracích 10 000 mg/l, ze kterých byly desítkovým ředěním připraveny vzorky o koncentraci 100 mg/l, 10 mg/l a 1 mg/l.

Vzorky a regenerační roztok (glycin) měřící aparaturou protékaly při pracovní průtokové rychlosti 50 µl/min. Po každém umístění biočipu do aparatury, čili před každým novým měřením, byla provedena kalibrace přístroje na základní signál puřrovacího roztoku PBS 10 M.

Příprava biočipu před vložením do aparatury a měřením spočívala v jeho omytí proudem demineralizované vody a následným osušením ofukem pomocí stříčky. Skladování biočipu po měření probíhalo tzv. na mokro. Po každém měření byly biočipy vždy uloženy do kádinky čerstvým 10 M roztokem PBS. Pozitivní vliv tohoto skladování pro udržení dlouhodobě stále odezvy biočipu je popsán v mé bakalářské práci [10].

Příklad postupu vstřikování jednotlivých vzorků a regeneračního roztoku je uveden v tabulce 7. Názvy vzorků ponechávám v anglickém tvaru, ale pro přehlednost zde uvedu české překlady použitých látek: Chicken egg albumin je albumin vaječného bílku slepičího vejce. Zbývající bovine, rat, porcine a sheep jsou sérové albuminy získané z hovězího dobytka, krysy, prasete a ovce.

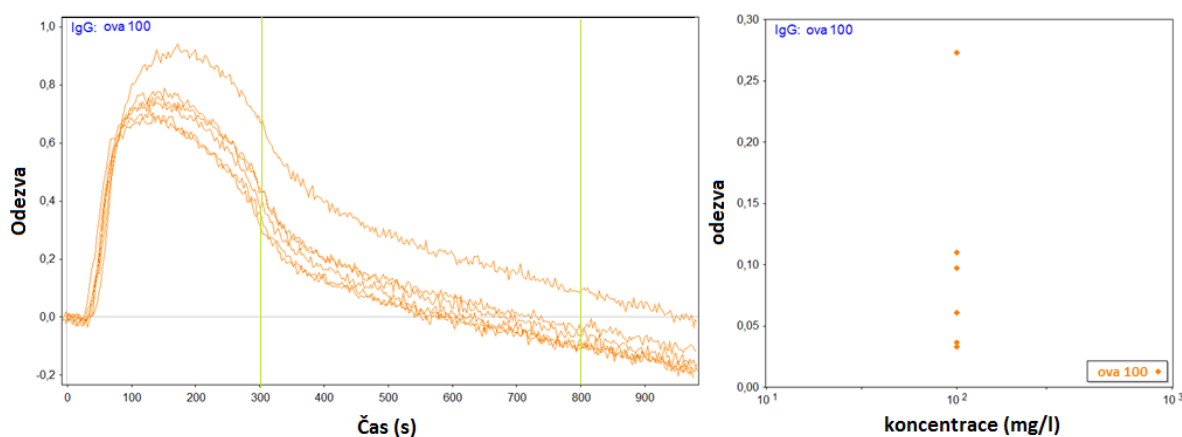
Tab. 7: Plán vstřikování vzorků a regeneračního roztoku glycinu pro jednodenní měření.

analyt	koncentrace mg/l
Glycin	
Chicken egg albumin	100
Glycin	
Bovine albumin	100
Glycin	
Rat albumin	100
Glycin	
Porcine albumin	100
Glycin	
Sheep albumin	100
Glycin	

4.4 Výsledky z měření - biočip 3389

K vyhodnocení dat jsem použila program ScrubberGen a tabulkový editor Excel. Plán pro měření na biočipu 3389 byl navržen pro 9 dní, kdy bylo změřeno celkem 53 různých vzorků. V tabulce 8 jsou uvedeny výsledné odezvy ze 4 dní měření. Za každou látku bylo naneseno 6 spotů. Příklad odezvy 6 spotů IgG je zobrazeno v grafu na obrázku 20.

Pro každý signál byla odezva vyhodnocena jako aritmetický průměr v časovém rozmezí 300-800 sekund. Za celková odezva této látky byla považována hodnota průměru ze všech šesti spotů. Stejný postupem byly zpracovány signály z ostatních nanesených látek (spotů) a tato data jsou přehledně zapsána v tabulce 8.

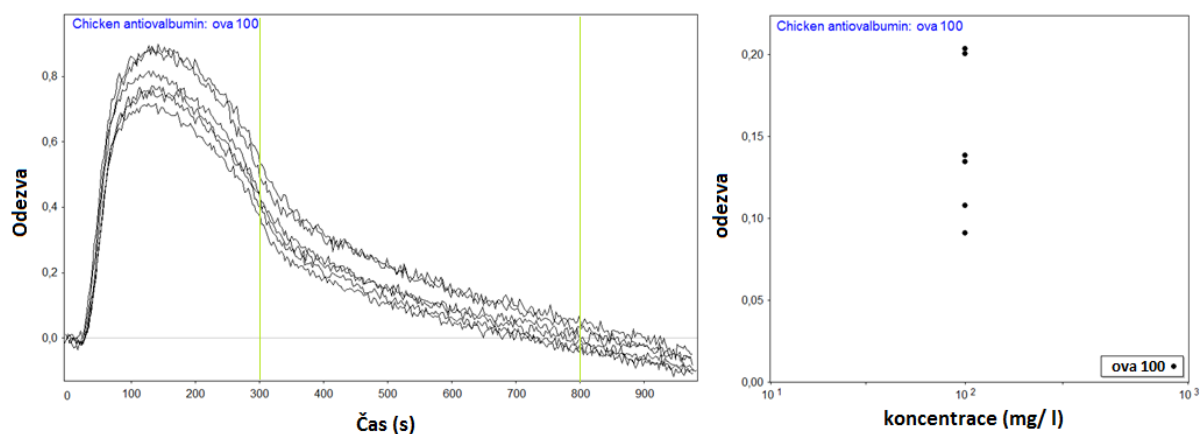


Obr. 20: Odezva IgG spotů na vzorek ovalbuminu o koncentraci 100 mg/l.

Graf vpravo má vynesené hodnoty aritmetického průměru signálu za časové rozmezí 300-800 s (zeleně vyznačeno v grafu napravo).

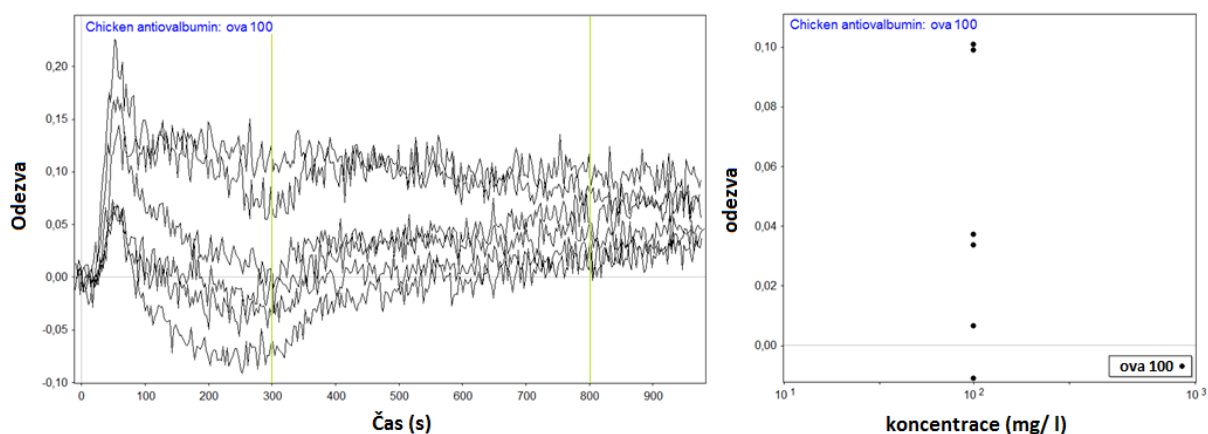
V tabulce 8 jsou uvedeny hodnoty odezvy všech spotů na všechny analyzované látky o dvou koncentracích 100 a 10 mg/l. Ve sloupcích označených jako rozdíl s IgG jsou zapsány odezvy spotů, od kterých byla odečtena odezva IgG spotů. Ty běžně slouží jako negativní kontrola. Graficky je tento rozdíl s negativní kontrolou zobrazen na signálu chicken antiovalbumin, kdy analytem byl roztok ovalbuminu o koncentraci 100 mg/l (Obr. 22).

Z grafů uvedených na obrázcích 20 a 21, lze pozorovat driftování signálu. Na ten má velký vliv nestabilní teplota prostředí. K odstranění tohoto driftu dojde právě odečtením signálu negativní kontroly - obrázek 22.



Obr. 21: Odezva chicken ovalbuminu na ovalbumin 100 mg/l (před odečtením IgG).

Jak již bylo zmíněno v kapitole Výroba SPRi biočipu, biočip 3389 se nepovedlo dobře naspotovat. Přesto byla provedena série měření. Uvedené výsledky v tabulce 8 nejsou bohužel uspokojivé. Celkově biočip vykazuje příliš nízkou odezvu, kdy se řádově pohybuje v desetinách až setinách anebo je dokonce záporná.



Obr. 22: Grafické znázornění odezvy chicken antiovalbuminu na ovalbumin 100 mg/l po odečtení signálu IgG.

Například pro kontrolu funkčnosti biočipu 3389 měla sloužit specifická reakce mezi chicken antialbuminem a ovalbuminem. Na tomto principu již bylo připraveno několik funkčních biočipů a jejich výsledky jsou uvedeny v již zmiňovaných studentských pracích [10, 42]. Z vyhodnocených vlastních dat ale vyplývá, že odezva pro koncentraci 100 mg/l je pouhých 0,16 a 0,03 a pro koncentraci 10 mg/l nenastává žádná odezva (odezva je záporná). Pro koncentraci 1 mg/l data nemají vypovídající hodnotu, a proto nejsou v práci vůbec uvedena.

Tab. 8. Tabulka vypočtených hodnot z měření na biočipu 3389.

		odezva		rozdíl s IgG				odezva		rozdíl s IgG	
spot	analyt	18.7.	19.7.	18.7.	19.7.		analyt	20.7.	21.7.	20.7.	21.7.
IgG	ova 100	0,11	-0,30				ova 10	0,29	0,22		
	bovine 100	-0,04	-0,34				bovine 10	0,50	0,18		
	rat 100	0,03	-0,26				rat 10	0,16	0,40		
	porcine 100	0,05	0,58				porcine 10	0,04	0,08		
	sheep 100	0,04	0,33				sheep 10	0,12	0,22		
anti-chicken	ova 100	0,27	-0,27	0,16	0,03		ova 10	0,23	0,19	-0,06	-0,02
	bovine 100	-0,11	-0,33	-0,07	0,01		bovine 10	0,43	0,16	-0,07	-0,03
	rat 100	0,05	-0,21	0,02	0,05		rat 10	0,12	0,33	-0,05	-0,07
	porcine 100	0,04	0,41	-0,01	-0,18		porcine 10	0,03	0,04	-0,01	-0,03
	sheep 100	0,03	0,26	-0,01	-0,07		sheep 10	0,10	0,17	-0,02	-0,06
HSA 8260	ova 100	0,36	-0,15	0,25	0,15		ova 10	0,26	0,20	-0,03	-0,02
	bovine 100	-0,03	-0,28	0,01	0,06		bovine 10	0,43	0,15	-0,07	-0,03
	rat 100	0,05	-0,19	0,02	0,07		rat 10	0,12	0,33	-0,04	-0,07
	porcine 100	0,07	0,53	0,02	-0,06		porcine 10	0,03	0,05	-0,01	-0,02
	sheep 100	0,03	0,25	-0,01	-0,08		sheep 10	0,09	0,18	-0,03	-0,05
Formaldehyd	ova 100	0,54	-0,08	0,43	0,21		ova 10	0,30	0,25	0,01	0,04
	bovine 100	-0,04	-0,29	-0,01	0,05		bovine 10	0,47	0,17	-0,03	-0,01
	rat 100	0,08	-0,16	0,05	0,10		rat 10	0,12	0,34	-0,04	-0,06
	porcine 100	0,10	0,50	0,05	-0,09		porcine 10	0,04	0,05	0,00	-0,03
	sheep 100	0,03	0,26	-0,01	-0,07		sheep 10	0,10	0,18	-0,03	-0,05
anti-bovine	ova 100	0,12	-0,28	0,01	0,02		ova 10	0,21	0,18	-0,08	-0,03
	bovine 100	-0,03	-0,36	0,01	-0,02		bovine 10	0,46	0,15	-0,04	-0,03
	rat 100	0,05	-0,22	0,03	0,04		rat 10	0,11	0,35	-0,05	-0,05
	porcine 100	0,01	0,43	-0,04	-0,16		porcine 10	0,02	0,05	-0,02	-0,03
	sheep 100	0,03	0,25	-0,01	-0,08		sheep 10	0,09	0,18	-0,03	-0,05
HSA 11	ova 100	0,14	-0,24	0,03	0,05		ova 10	0,23	0,20	-0,06	-0,02
	bovine 100	-0,12	-0,35	-0,08	-0,02		bovine 10	0,45	0,17	-0,05	-0,01
	rat 100	0,04	-0,21	0,01	0,05		rat 10	0,10	0,34	-0,06	-0,06
	porcine 100	0,03	0,64	-0,02	0,05		porcine 10	0,03	0,04	-0,01	-0,04
	sheep 100	0,04	0,38	0,00	0,05		sheep 10	0,09	0,17	-0,03	-0,06

Z dílčího experimentu s formaldehydem také nelze usuzovat, že by došlo k předpokládanému výsledku. HSA 8960 smíchaný s formaldehydem vykazuje sice kladné odezvy, ale ty jsou opět velice nízké u všech měřených analytů. Nelze tedy vyvodit, zda se jedná o vhodnou negativní kontrolu.

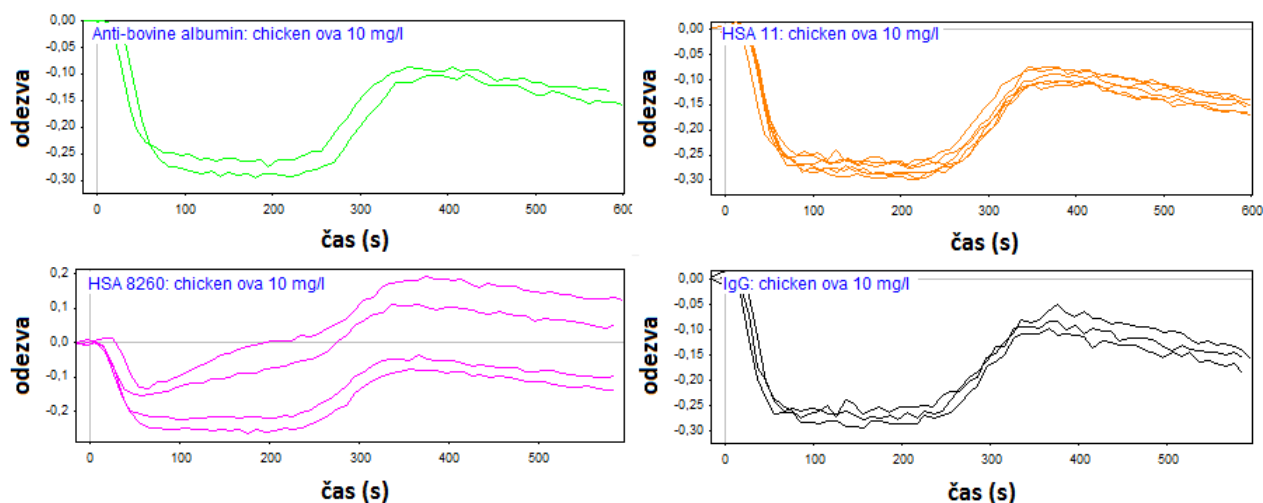
Pozorovat z výsledků tzv. cross-reakce neboli specifické odezvy mezi antigenem a protilátkou, není kvůli nízkým odezvám umožněno. Přesto, že jsou tyto údaje dostupné a uvádím je v tabulce 9, nepodařilo se je měřením na biočipu 3389 ověřit.

Tab. 9. Tabulka srovnání cross-reakcí mezi použitými antigeny a protilátkami.

antigen	Specifická reakce se sérovými albuminy (míra reakce)	Nespecifická reakce se sérovými albuminy	citace
HSA 11	Lidský albumin, gibbon, opice (druh rhesus a pavián)	Křeček, krysa, hovězí dobytek, krůta, kuře, koza, vepř, králík, ovce, holub, morče, osel	[39]
Anti-Bovine	hovězí dobytek (vysoká), ovce (vysoká), koza (vysoká), krůta (nízká), kůň (nízká),	Lidský albumin, krysa, vepř, ovalbumin slepičího vejce, králík, osel, Ovalbumin krůtiho vejce	[45]
Anti-Chicken	Ovalbumin slepičího vejce, Ovalbumin krůtiho vejce	Krysa, hovězí dobytek, koza, osel, králík, myš, ovce, vepř	[46]

4.5 Výsledky z měření - biočip 3385

Příprava druhého biočipu 3385 již z pozorování obrázku nedopadla dobře. Měření proběhlo jen na natištěných spotech a těch bylo pouze 15 z celkového počtu 36. Na tomto biočipu byly měřeny vzorku pouze ovalbuminu o koncentraci 10 mg/l. Nepodařilo se natisknout ani jeden spot látky anti-chicken albumin. Z toho důvodu získané odezvy neodpovídají specifické reakci. Na biočipu 3385 bylo provedeno měření pouze během dvou dnů, protože před třetím měřením došlo k jeho mechanickému poškození při vkládání do měřicí aparatury.



Obr. 23: Biočip 3385: odezva viditelně natištěných spotů na ovalbumin 10 mg/l.

Grafy zobrazené na obrázku 23 odpovídají odezvě natištěných spotů na ovalbumin o koncentraci 10 mg/l. Jedná se o první měření na vyrobeném biočipu 3385. Bohužel naspotované látky s analytem nereagují. Pravděpodobně je to tím, že s daným analytem netvoří specifickou vazbu.

4.6 Charakterizace povrchu biočipu pomocí AFM

V rámci této práce byla provedena měření drsnosti povrchu SPRi biočipu pomocí mikroskopie atomárních sil. Tato měření proběhla v laboratořích Centra nanotechnologií Vysoké školy báňské - Technické univerzity v Ostravě, kdy samotnou obsluhu AFM mikroskopu a naměřená data zajistila Ing. Klára Drobíková. Měření proběhlo za použití mikroskopu atomárních sil firmy NT-MDT, značka modelu AFM Solver NEXT. Naměřená data jsem následně zpracovala v softwaru Gwyddion (verze 2.31). Ten umožnil vypočítat parametry drsnosti a pořízené snímky mohly být barevně upraveny a převedeny na 3D model.

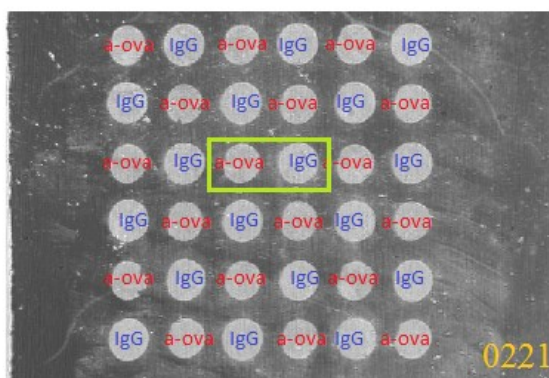
Pro charakterizaci povrchu SPRi biočipu jsme zvolily semikontaktní mód, který je vhodný pro měření biologických vzorků nebo také měkkých vzorků. Byla použita sonda se značením NSG 30 a její specifikace spolu s parametry raménka jsou uvedeny v tabulce 10.

Tab. 10: Specifikace sondy NSG 30.

Velikost sondy (d x š x v):		3,4 x 1,6 x 0,3 mm		
Materiál sondy:		krystal Si, N-typ, dopováno Sb		
Reflexní strana (materiál):		Au		
Poloměr zakřivení hrotu:		10 nm		
Délka raménka	Šířka raménka	Tloušťka raménka	Rezonanční frekvence	Silová konstanta
125 μm	40 μm	3,5-4,5 μm	240-440 kHz	22-100 N/m

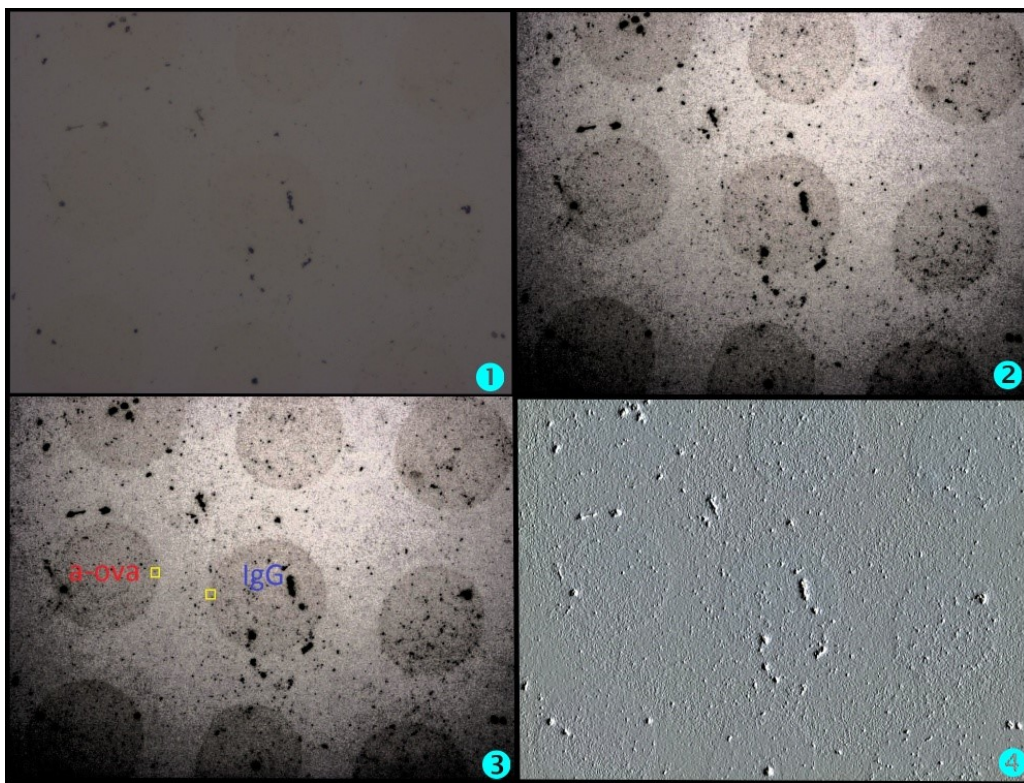
Jako vzorek byl použit již starší SPRi biočip s označením 0221. Jedná se o biočip pro analýzu ovalbuminu. Zlatý povrch biočipu tedy nese povrchovou chemii CS a dále pak spoty myšího imunoglobulinu IgG a protilátky anti-ovalbumin (a-ova). Tyto spoty jsou uspořádány do matice 6x6, viz obrázek 24.

Na obrázku je také vyznačena oblast (zelený rámeček), kde probíhalo skenování pomocí AFM. Pro skenování byly snímány tři různě velké oblasti 25x25 μm, 50x50 μm a 75x75 μm vždy při stejném počtu 256 skenovaných bodů. Počet bodů určuje, kolikrát je signál v jednom směru zaznamenán.



Obr. 24: Upravený snímek biočipu 0221 pořízen CCD kamerou SPRI-Lab⁺.

Skenování probíhalo zleva do prava a skenovalo se vzorkem. Rychlost skenování byla nastavena na 0,3 Hz. Při semikontaktním módu se hrot pravidelně dotýká povrchu vzorku a ten je tímto znehodnocen. Proto nikdy nedošlo ke skenování jedné oblasti dvakrát.



Obr. 25: Snímky pořízené CCD kamerou AFM mikroskopu. Snímek 3 s vyznačenými místy přechodu (žluté rámečky).

Pro charakterizaci pomocí AFM byl vybrán starší biočip, který byl používán k měření v roce 2014 a nyní již nemá při analýze SPRI požadovanou odezvu. Na obrázku 25 jsou zobrazeny snímky z CCD kamery AFM mikroskopu. První snímek je neupravený a zbývající byly upraveny v programu Zoner Photo Studio, aby vynikly spoty biočipu. Třetí snímek zobrazuje dva spoty, na kterých proběhla měření. Ve žlutých rámečcích jsou zvýrazněna

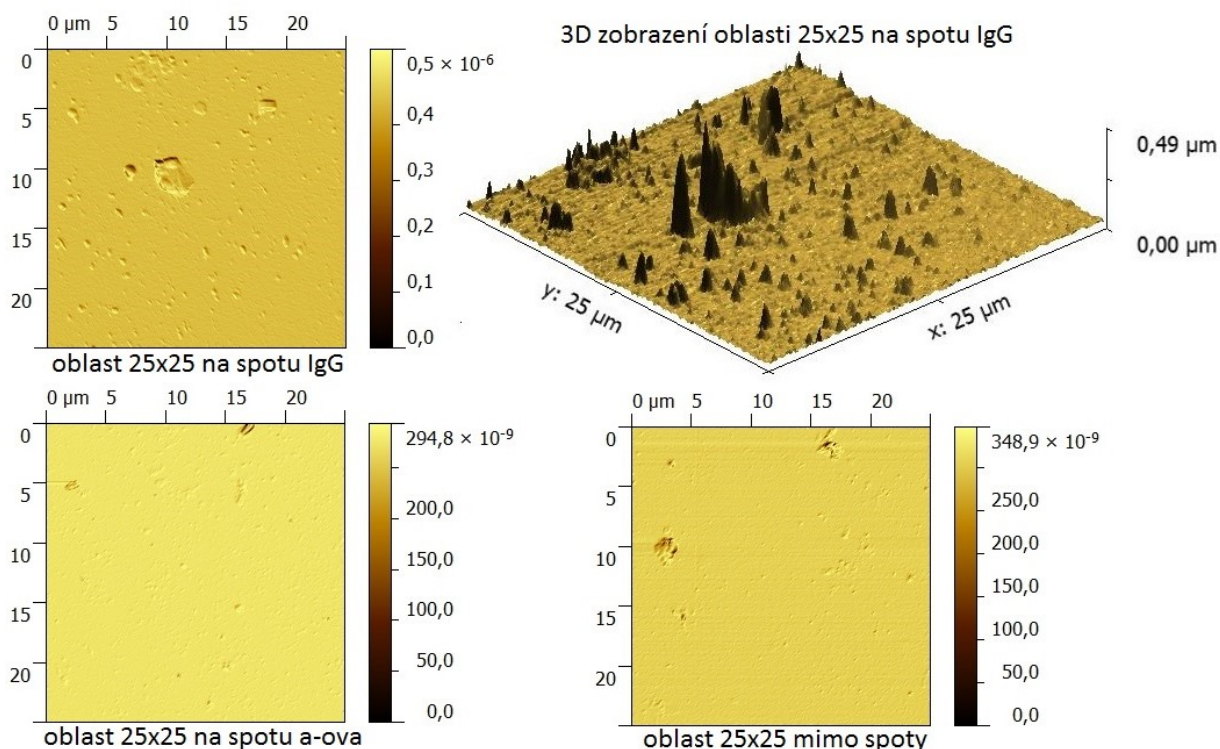
místa přechodu. Čtvrtý snímek je upraven tzv. protlačením a lze si povšimnout, že spoty jsou plastické.

Měření proběhla na spotu IgG, na spotu anti-ovalbuminu, mimo spot a také na oblasti přechodu mezi spotem a neaktivním povrchem, viz snímek 3 na obrázku 25. V tabulce 11 jsou zapsány parametry drsnosti pro skenovanou plochu v jednotlivých spotech a mimo ně.

Parametr drsnosti R_a se pohybuje řádově v jednotkách nanometrů a to svědčí o tom, že povrch biočipu je hladký. Z porovnání drsnosti na spotu a mimo něj vidíme, že na spotu je obecně drsnost přibližně dvakrát vyšší. Uváděné hodnoty parametrů drsnosti jsou průměrem z pěti měření dané oblasti.

Tab. 11: Plošná drsnost uvedených oblastí na biočipu.

	Plošná drsnost R_a	R_{MS}
spot - IgG	6,9 nm	18,3nm
spot - a-ova	6,0 nm	15,3nm
mimo spot	3,5 nm	9,9nm

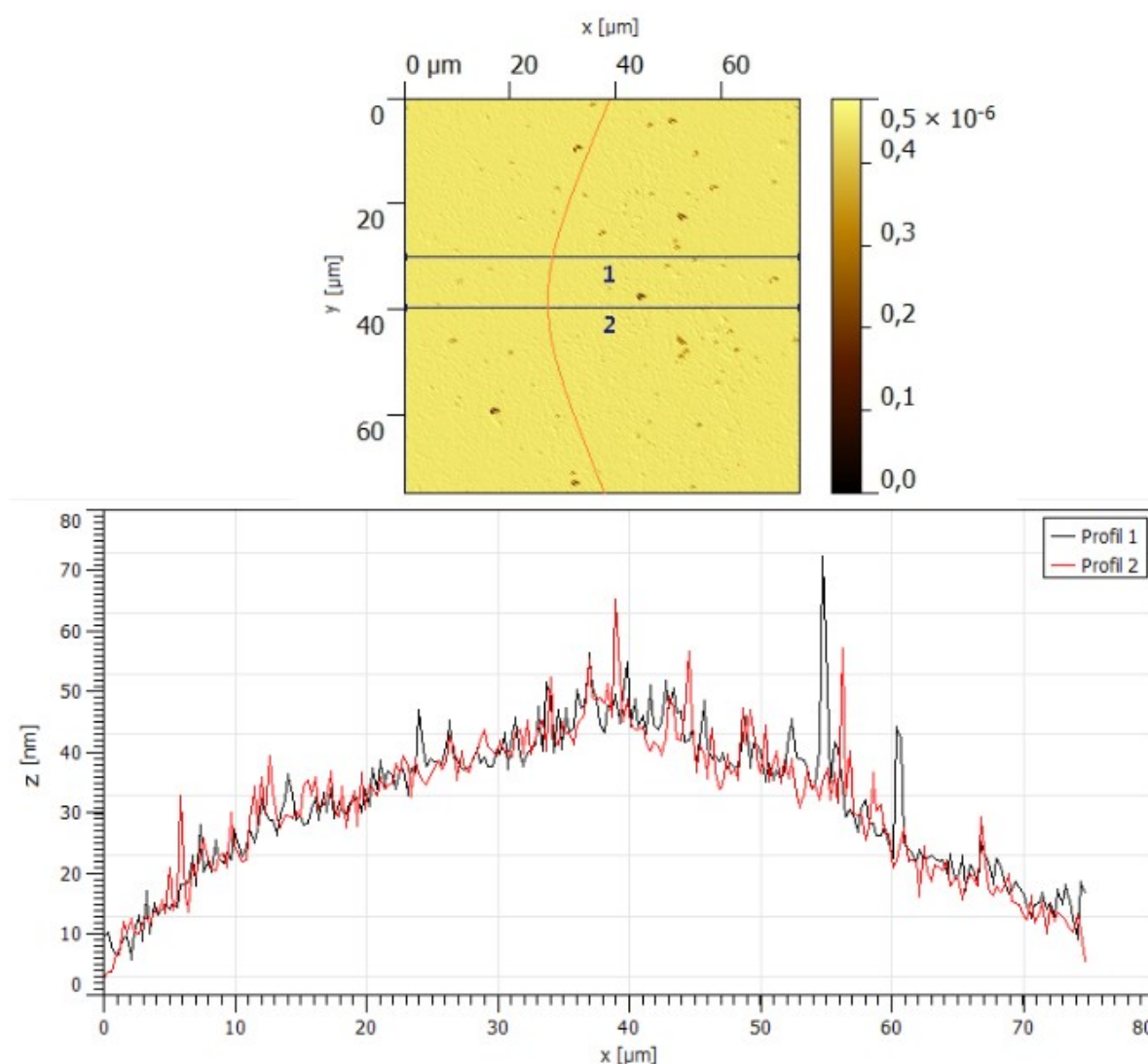


Obr. 26: AFM snímky oblastí na spotech a mimo ně. Vpravo nahoře 3D model povrchu oblasti IgG.

Na obrázcích 26, 27 a 28 lze poznat, že vzorek je až na drobné nečistoty opravdu hladký. To, že jsou nečistoty přítomny, lze vidět z rozdílu hodnot parametrů R_a a R_{MS} . Hodnota R_{MS} je vždy vyšší než R_a , protože hodnoty jsou umocněny druhou mocninou, a tím mají výchyly způsobené nečistotami vyšší váhu.

Přechod ze spotu na neaktivní povrch je viditelný z následných profilů vykreslených na obrázcích 28 a 29. Profily jsou generovány podle zobrazených očíslovaných linií 1 a 2. Přechod u spotu IgG ale také u spotu a- ova je jen přibližně naznačen oranžovou hranicí, která je do snímku přikreslena. Spot IgG se nachází napravo od nakreslené hranice.

Profil získaný na spotu IgG má tvar paraboly. Tento tvar by měl vypovídající hodnotu, pokud by byl profil veden přes celý průměr spotu, který má velikost mezi 300-350 μm . Snímek však zachycuje pouze oblast 75x75 μm . Na snímku není patrná žádná viditelná hranice například schodový přechod, která by naznačovala přítomnost spotu.

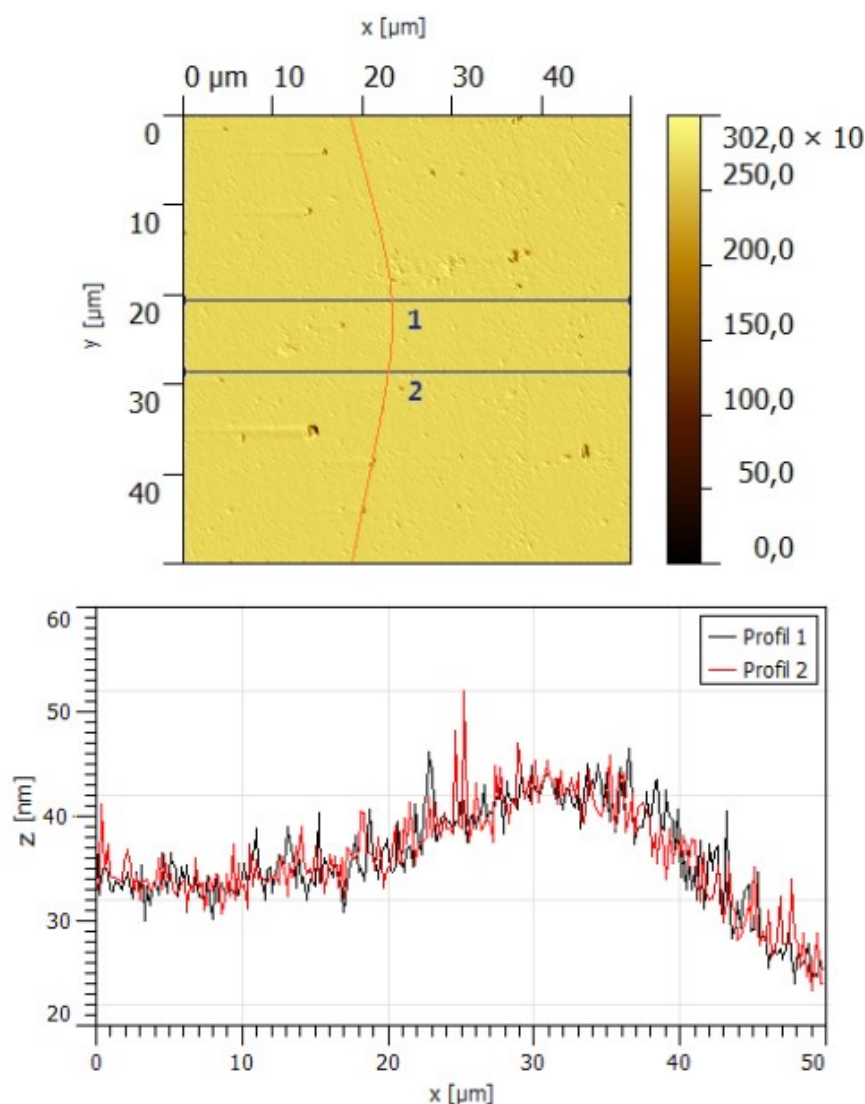


Obr. 27: Nahoře: snímek přechodu IgG o velikosti 75x75 μm se zakreslenou pomyslnou hranicí. Spot se nachází napravo od zakreslené čáry. Dole: profily dvou linií ze snímku výše.

Z tvaru profilu by mohlo být usouzeno, že spot je uvnitř například vyschlý a po obvodu je zachována pouze vyvýšená hranice. Výška této hranice se od místa mimo spot pohybuje

kolem 40 - 50 nm. Aby se tato teorie potvrdila, bylo by nutné provést další měření po celém obvodu myšleného spotu.

Profil přechodu ze spotu a-ova není tolik odlišný od přechodu na spotu IgG. Na snímku (obrázek 28) je vyobrazena oblast o velikosti 50x50 μm . Spot a-ova se nachází nalevo od dokreslené hranice. Z předloženého snímku není reálná hranice spotu viditelná. Z uvedeného profilu však již lze pozorovat, že spot by mohl být po obvodu tvořen vyvýšenou hranicí. Ta je užší než u IgG, protože lze vidět, že profil je v oblasti 0 - 20 μm ve výšce 35 nm, poté dosahuje vrcholu 40 nm kolem oblasti při 30 μm a následně klesá až na 25 nm. Pro lepší posouzení hranice a ověření, zda výškové rozdíly oblasti spotu a mimo spot vůbec hranici tvoří, by bylo nutné provést více měření.



Obr. 28: Nahoře je snímek přechodu spotu a-ova se zakreslenou myšlenou hranicí. Dále nese vyobrazené dvě linie, které tvoří níže uvedené profily.

Charakterizace biočipu pomocí AFM podala bližší informace o jeho povrchu. Z uvedených snímků lze pozorovat, že povrch biočipu je znečištěn částicemi neznámého původu. Může se jednat o prachové částice nebo vykrystalizovaný roztok PBS, ve kterém byl biočip 221 po dobu SPRi měření dříve uchováván.

Povrch mohl být také zanesen vlivem nedokonalého očištění po měření. Charakterizace těchto nečistot však nebyla předmětem měření pomocí AFM.

Z hodnot parametrů drsnosti bylo určeno, že povrch je zcela hladký i přes přítomnost nečistot. Rozdíl mezi drsnostmi na spotu (6,9 a 6 nm) a mimo něj (3,5 nm) není příliš velký. Pro určení toho jestli jsou spoty vůči zlatému povrchu vyvýšené či ohraničené nelze s přesností z pořízených dat určit. Bylo by potřeba provést mnohem více měření po obvodu spotu.

5 Závěr

V teoretické části své práce jsem vypracovala rešerši z dostupné literatury o metodě SPRi. Po výčtu základních pojmů z optiky a popisu jevu a podmínek vzniku rezonance povrchových plasmonů, jsem se zaměřila na moderní typy biosenzorů. SPRi biočipy a biosenzory jsou čím dál víc uplatňovány v klinických diagnostikách pro detekci alergenů v potravinách, pro stanovení lékařských diagnóz, pro screening drog a ve výzkumu proteinů a nukleových kyselin pro sledování biochemických interakcí.

Na základě poznatků z prostudované literatury jsem navrhla vlastní experiment a realizovala měření pomocí metody SPRi. Pro vlastní měření jsem navrhla a připravila dva SPRi biočipy. Příprava biočipu a praktická měření probíhala v laboratořích Vysoké školy báňské - TUO. A souhrn postupů spolu s vyhodnocením těchto měření jsou obsahem praktické části mé práce.

Snahou této práce bylo nalézt vhodnou referenční látku pro účely negativní kontroly. Na základě tohoto požadavku jsem navrhla sérii biochemických měření, při kterých jsem sledovala odezvy nanesených látek na biočipu. Mezi sledované látky jsem zvolila různé druhy antigenů - lidský, hovězí a drůbeží a pak také myší imunoglobulin typu G - IgG, který běžně slouží jako negativní kontrola.

Stále aktuálním a dlouhodobým cílem u SPRi metody je detekovat co možná nejnížší koncentrace látek v reálných vzorcích. V rámci vlastního experimentu jsem pracovala se vzorky standardními a zvolila jsem si práci při nízkých koncentracích (100, 10 a 1 mg/l). Pro účely experimentu byly detekovány sérové albuminy různých zvířecích druhů a ovalbumin - albumin vaječného bílku.

V rámci praktické části je práce také doplněna o charakterizaci povrchu SPRi biočipu pomocí mikroskopie atomárních sil. Kdy došlo k určení parametrů drsnosti a zobrazení povrchu biočipu v oblasti na spotu, mimo spot i na přechodu, což přineslo velmi důležité informace o dynamice kapaliny po povrchu biočipu.

Ze zhodnocení a diskuze k výrobě biočipu vyplývá, že připravit kvalitní biočip vhodný k měření je náročný proces. Existuje mnoho faktorů, které mají na finální funkci biočipu vliv. Zda bude mít biočip požadovanou odezvu, lze zjistit až při praktickém měření. A velmi důležitým faktorem je vhodná volba povrchové chemie pro dané účelové použití a biochemikálie.

Přesto, že z výsledků měření nelze vyhodnotit, zda se mezi použitými látkami nacházela vhodná negativní kontrola, myslím si, že tato práce má na poli výzkumu svůj přínos.

6 Seznam použité literatury

- [1] HALLIDAY, David, et al.. *Fyzika: vysokoškolská učebnice obecné fyziky*. Vyd. 1. Brno: VUTUM ; Praha, 2000, vii, s. 890-1032, ISBN 80-214-1868-0.
- [2] FUKA, Josef a Bedřich HAVELKA. *Optika: Atomová fyzika: I. Optika*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1961.
- [3] SCHASFOORT, R, et al. *Handbook of surface plasmon resonance*. Cambridge: RSC Publishing, c2008, xxi, 403 s. ISBN 978-0-85404-267-8.
- [4] HORÁK, Zdeněk a František KRUPKA. *Fyzika: příručka pro fakulty strojního inženýrství*. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1966.
- [5] SEDLÁK, Bedřich, et al.. *Elektrina a magnetismus*. Vyd. 2., opr. a rozš. Praha: Academia, 2002, 632 s. ISBN 80-200-1004-1.
- [6] SKLÁDAL, Petr. 2002. *Biosenzory* [online]. Brno. [cit. 2017-03-16] Dostupné také z: <http://orion.chemi.muni.cz/pskl/vyuka/Biosensory.pdf>
- [7] HOMOLA, Jiří. Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species. *Chemical Reviews* [online]. 2008, **108**(2), 462-493 [cit. 2017-11-24]. DOI: 10.1021/cr068107d. ISSN 0009-2665. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr068107d>
- [8] KITTEL, Charles, et al.. *Úvod do fyziky pevných látek*. Vyd. 1. Praha: Academia, 1985, 598 s.
- [9] PITARKE, J M, V M SILKIN, E V CHULKOV a P M ECHENIQUE. Theory of surface plasmons and surface-plasmon polaritons. *Reports on Progress in Physics* [online]. 2007, **70**(1), 1-87 [cit. 2017-11-24]. DOI: 10.1088/0034-4885/70/1/R01. ISSN 0034-4885. Dostupné z: <http://stacks.iop.org/0034-4885/70/i=1/a=R01?key=crossref.5b1052b473009d0de2f21c63e367f570>
- [10] JANATA, Jiří. 2007. *Senzory* [online]. Praha. [cit. 2017-04-15] ISBN 978-80-86238-20-3. Dostupné také z: <http://old.vscht.cz/anl/paci/PAC/prezentace/senzory.pdf>
- [11] HOMOLA, Jiří, et al.. Surface plasmon resonance biosensors. *Optical Biosensors*. 2002, č. 2, s. 207-251

[12] GROSMANOVÁ, Zuzana. *SPRi měřicí metoda pro biochemickou analýzu* [online]. 2015 [cit. 2017-11-24]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/10084/109858>. Bakalářská práce. Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava.

[13] HE, Lijie, Quentin PAGNEUX, Iban LARROULET, et al. Label-free femtomolar cancer biomarker detection in human serum using graphene-coated surface plasmon resonance chips. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2017, **89**, 606-611 [cit. 2017-11-23]. DOI: 10.1016/j.bios.2016.01.076. ISSN 09565663. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566316300859>

[14] TYAGI, Deependra, Javier Batista PEREZ, Amita NAND, Peizhe WANG, Jie NA a Jingsong ZHU. Application of surface plasmon resonance imaging technique for iPSCs identification. *Science Bulletin* [online]. 2015, **60**(4), 483-485 [cit. 2017-11-23]. DOI: 10.1007/s11434-015-0731-1. ISSN 20959273. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095927316304893>.

[15] FATHI, Farzaneh, Reza RAHBARGHAZI a Mohammad-Reza RASHIDI. Label-free biosensors in the field of stem cell biology. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2018, **101**, 188-198 [cit. 2017-11-23]. DOI: 10.1016/j.bios.2017.10.028. ISSN 09565663. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566317306954>.

[16] ASHLEY, J., M. PIEKARSKA, C. SEGERS, L. TRINH, T. RODGERS, R. WILLEY a I.E. TOTHILL. An SPR based sensor for allergens detection. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2017, **88**, 109-113 [cit. 2017-11-23]. DOI: 10.1016/j.bios.2016.07.101. ISSN 09565663. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566316307321>

[17] HIEP, Ha Minh, Tatsuro ENDO, Kagan KERMAN, Miyuki CHIKAE, Do-Kyun KIM, Shohei YAMAMURA, Yuzuru TAKAMURA a Eiichi TAMIYA. A localized surface plasmon resonance based immunosensor for the detection of casein in milk. *Science and Technology of Advanced Materials* [online]. 2016, **8**(4), 331-338 [cit. 2017-11-23]. DOI: 10.1016/j.stam.2006.12.010. ISSN 1468-6996. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1016/j.stam.2006.12.010>

[18] GOMAA, Ahmed a Joyce BOYE. Impact of irradiation and thermal processing on the immunochemical detection of milk and egg allergens in foods. *Food Research International* [online]. 2015, **74**, 275-283 [cit. 2017-11-23]. DOI: 10.1016/j.foodres.2015.05.023. ISSN 09639969. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996915300132>

- [19] SCARANO, S., E. CARRETTI, L. DEI, P. BAGLIONI a M. MINUNNI. Coupling non invasive and fast sampling of proteins from work of art surfaces to surface plasmon resonance biosensing: Differential and simultaneous detection of egg components for cultural heritage diagnosis and conservation. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2016, **85**, 83-89 [cit. 2017-11-23]. DOI: 10.1016/j.bios.2016.04.093. ISSN 09565663. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566316303797>
- [20] MEHROTRA, Parikha. Biosensors and their applications – A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* [online]. 2016, **6**(2), 153-159 [cit. 2016-05-26]. DOI: 10.1016/j.jobcr.2015.12.002. ISSN 22124268. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212426815001323>
- [21] TEMPLIER, Vincent, Agnès ROUX, Yoann ROUPIOZ a Thierry LIVACHE. Ligands for label-free detection of whole bacteria on biosensors: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2016, **79**, 71-79 [cit. 2016-05-26]. DOI: 10.1016/j.trac.2015.10.015. ISSN 01659936. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993615301163>
- [22] AMINE, A., F. ARDUINI, D. MOSCONE a G. PALLESCHI. Recent advances in biosensors based on enzyme inhibition. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2016, **76**, 180-194 [cit. 2016-05-26]. DOI: 10.1016/j.bios.2015.07.010. ISSN 09565663. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095656631530258X>
- [23] CRIVIANU-GAITA, Victor a Michael THOMPSON. Aptamers, antibody scFv, and antibody Fab' fragments: An overview and comparison of three of the most versatile biosensor biorecognition elements. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2016, **85**(2), 32-45 [cit. 2016-05-26]. DOI: 10.1016/j.bios.2016.04.091. ISSN 09565663. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566316303694>
- [24] Surface chemistry. *HORIBA: Scientific* [online]. [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: <http://www.horiba.com/cz/scientific/products/surface-plasmon-resonance-imaging-spri/spri-platform/functionalised-sensor-chips/>
- [25] MARIANI, Stefano, et al.. Surface plasmon resonance applications in clinical analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2014, **406**(9-10): 2303-2323 [cit. 2017-04-18]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-014-7647-5>
- [26] LIU, Boshi, Xia LIU, Se SHI, Renliang HUANG, Rongxin SU, Wei QI a Zhimin HE. Design and mechanisms of antifouling materials for surface plasmon resonance sensors. *Acta*

Biomaterialia. 2016, **2016**(40), 100-118. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.02.035. ISBN 10.1016/j.actbio.2016.02.035. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706116300782>

[27] MOSS, G. P., P. A. S. SMITH a D. TAVERNIER. Glossary of class names of organic compounds and reactivity intermediates based on structure (IUPAC Recommendations 1995). In: *Pure and Applied Chemistry*. 1995-01-1, **67**(8-9), s. -. DOI: 10.1351/pac199567081307. ISSN 1365-3075. Dostupné také z: <http://www.degruyter.com/view/j/pac.1995.67.issue-8-9/pac199567081307/pac199567081307.xml>

[28] KUMAR, Deepak a Dibyajyoti BANERJEE. Methods of albumin estimation in clinical biochemistry: Past, present, and future. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2017, **469**, 150-160 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1016/j.cca.2017.04.007. ISSN 00098981. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898117301237>

[29] PETERS, Theodore. *All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications*. San Diego: Academic Press, c1996. ISBN 978-0-12-552110-9.

[30] Human Serum Albumins. In: *SIGMA-ALDRICH: Albumin* [online]. [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/biochemicals/biochemical-products.html?TablePage=103994917>

[31] *Bioléčiva*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008, s. 49. ISBN 978-80-7080-678-4.

[32] Albumin. *Datový standard MZ ČR - verze 4: Webové služby pro distribuci číselníků datového standardu, DTD a schemat* [online]. Praha, 2002 [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/JAACH.htm>

[33] BOUČEK, Petr. Diabetická nefropatie. *Medicína pro praxi* [online]. 2008, **5**(9), 313-316 [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: <http://www.solen.cz/pdfs/med/2008/09/08.pdf>

[34] Scanning probe techniques. *Characterization of materials*. Second edition. Hoboken, New Jersey: John Wiley, 2012, s. 2267-2302. ISBN 9781118414477.

[35] VŮJTEK, Milan, Roman KUBÍNEK a Miroslav MAŠLÁŇ. *Nanoskopie*. V Olomouci: Univerzita Palackého, 2012, 122 s. ISBN 978-80-244-3102-4.

- [36] SPM Principles: Semicontact techniques. In: *NT-MDT Spectrum Instruments* [online]. [cit. 2017-05-05]. Dostupné z: <https://www.ntmdt-si.com/spm-principles/view/semicontact-techniques>
- [37] SOLAŘ, RNDr. Pavel. *Mikroskopie atomových sil povrchů makromolekulárních látek*. Praha, 2007. Bakalářská práce. Karlova Univerzita v Praze. Vedoucí práce Prof. RNDr. Hynek Biederman, DrSc.
- [38] Albumin from chicken egg white: Product. *SIGMA-ALDRICH* [online]. [cit. 2017-12-30]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a5503?lang=en&ion=CZ>
- [39] B2901 - Monoclonal Anti-Bovine Serum Albumin antibody produced in mouse: Product. *SIGMA-ALDRICH* [online]. [cit. 2017-05-12]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/b2901?lang=en&ion=CZ>
- [40] PETERS JR., Theodore. The Biosynthesis of Rat Serum Albumin: III. AMINO ACID COMPOSITION OF RAT ALBUMIN. *The Journal of biological chemistry* [online]. U.S.A., 1962, **237**(7), 1-3 [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: <http://www.jbc.org/content/237/7/2182.full.pdf>
- [41] KESHAN ZHANG,. Analysis of pig serum proteins based on shotgun liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY* [online]. 2012, **11**(57), - [cit. 2017-12-30]. DOI: 10.5897/AJB12.933. ISSN 16845315. Dostupné z: [http://www.academicjournals.org/ajb/abstracts/abs2012/17Jul/Zhang et al.htm](http://www.academicjournals.org/ajb/abstracts/abs2012/17Jul/Zhang%20et%20al.htm)
- [42] Albumin from sheep serum: Product. *SIGMA-ALDRICH* [online]. [cit. 2017-12-30]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Product_Information_Sheet/a6289pis.pdf
- [43] SPRi-Arrayer: Overview. *Horiba Scientific* [online]. [cit. 2017-12-30]. Dostupné z: <http://www.horiba.com/scientific/products/surface-plasmon-resonance-imaging-spri/spri-platform/spotting-systems/details/spri-arrayer-78/>
- [44] ŠEVČÁK, Vojtěch. *Biochemické měření metodou SPRi* [online]. Ostrava, 2014 [cit. 2017-12-30]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/10084/105184>. Bakalářská práce. Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava.

[45] A6684 - Monoclonal Anti-Albumin antibody produced in mouse: Product. *SIGMA-ALDRICH* [online]. [cit. 2017-05-12]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a6684?lang=en&ion=CZ>

[46] A6075 - Monoclonal Anti-Chicken Egg Albumin (Ovalbumin) antibody produced in mouse: Product. *SIGMA-ALDRICH* [online]. [cit. 2017-05-12]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a6075?lang=en&ion=CZ>